

UNIVERSITÀ DI PISA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, ALIMENTARI E
AGRO-AMBIENTALI



Corso di Laurea Magistrale in
Biosicurezza e Qualità degli Alimenti

**ANALISI DELLA COMPONENTE PROTEICA E
AMMINOACIDICA DI CEREALI E LEGUMI
COLTIVATI IN BIOLOGICO**

Candidato

Luigi **BENIVEGNA**

Relatore

Ch.ma Prof.ssa Annamaria **RANIERI**

Correlatore

Ch.mo Dr. Rodolfo **BERNARDI**

Anno Accademico 2015/2016

INDICE GENERALE

1. INTRODUZIONE	5
1.1 I CEREALI	6
1.1.1 Caratteristiche botaniche e morfobiologiche	7
1.1.2 Esigenze di adattamento a condizioni sfavorevoli	8
1.1.3 Importanza economica	9
1.1.4 Tecniche di coltivazione	10
1.1.5 Composizione e qualità nutraceutica dei cereali	12
1.2 LEGUMNOSE DA GRANELLA	14
1.2.1 Caratteristiche botaniche	15
1.2.2 Importanza economica	16
1.2.3 Tecniche di coltivazione	17
1.2.4 Valore nutrizionale della granella delle proteaginose	18
1.2.5 Fattori antinutrizionali della granella	21
1.2.6 Utilizzazione della granella	22
1.4 LE PROTEINE	29
1.4.1 Classificazione delle proteine	32
1.4.2 Proprietà funzionali delle proteine	33
1.4.3 Aspetti nutrizionali e assorbimento	35
1.4.4 Fabisogno proteico	41
1.5 GLI AMMINOACIDI	43
1.5.1 Assorbimento e fabisogno degli amminoacidi	44

2. SCOPO DELL'ATESI	46
3. MATERIALI E METODI	47
3.1 Descrizione.....	47
3.2. Campionamento	48
3.3. Analisi quantitativa: determinazione dell'azoto totale.....	48
3.4 Estrazione delle frazioni proteiche.....	49
3.5 Quantificazione spettrofotometrica.....	52
3.6 Analisi del profilo proteico mediante elettroforesi SDS-PAGE	53
3.7 Determinazione degli amminoacidi mediante cromatografia liquida	
4. RISULTATI	57
4.1 Determinazione dell'azoto totale nelle leguminose	58
4.2 Risultati frazioni proteiche dei legumi	59
4.3 Risultati analisi elettroforesi SDS-PAGE dei legumi	63
4.4 Risultati analisi cromatografica-HPLC dei legumi	65
4.5 Risultati della determinazione dell'azoto totale nei cereali	73
4.6 risultati delle frazioni proteiche dei cereali	75
4.7 Risultati analisi elettroforesi SDS-PAGE	77
4.8 Risultati analisi cromatografica-HPLC nei cereali	80
5. DISCUSSIONE	91
6. CONCLUSIONI	97
7. BIBLIOGRAFIA	101
8. RINGRAZIAMENTI	106

1. INTRODUZIONE

Nella realtà odierna si pone sempre maggior attenzione a comportamenti che favoriscono il benessere e la salute dell'uomo e, a questo proposito, l'aspetto nutrizionale ha acquistato un ruolo di primaria importanza. La crescente consapevolezza del consumatore di rivolgersi verso la scelta di prodotti di alta qualità e a basso impatto ambientale ha indotto lo sviluppo di un'agricoltura ecosostenibile, con l'obiettivo di valorizzare i prodotti colturali accrescendone così il valore nutrizionale. Tra i prodotti oggetto del miglioramento, che occupano una grossa fetta del mercato, troviamo i cereali e i legumi (agriregioneeuropa 2012). Questi prodotti rappresentano dei componenti alimentari chiave, in particolare nei paesi sviluppati. Infatti, il consumo di alimenti ricchi in proteine, compresi i prodotti lattiero-caseari, richiede un incremento dell'allevamento di bestiame con la conseguente maggiore domanda di cereali da foraggio, legumi e semi oleosi. Tuttavia, gli incrementi di produzione sono limitati da diversi fattori che vanno da quelli economici, alle ripercussioni ambientali, ai cambiamenti del contesto politico. Cereali e legumi sono alla base della dieta Mediterranea e la loro assunzione è considerata di fondamentale importanza per la salute umana. Infatti, l'impiego di prodotti a base di cereali, specialmente se integrali, può aiutare a regolare i livelli di glucosio nel sangue e limitare problemi di obesità, diminuendo di conseguenza il rischio di mortalità per malattie cardiovascolari nonché quello di sviluppare certi tipi di cancro. L'inclusione dei legumi nella dieta quotidiana invece aiuta a controllare e prevenire malattie metaboliche come il diabete mellito, le malattie coronariche e il cancro del colon. Il potenziale nutrizionale delle leguminose è legato principalmente al loro alto livello di proteine (18–25%) e al contenuto in carboidrati a lento rilascio. Queste proteine sono accumulate durante lo sviluppo dei semi in organelli, vacuoli di stoccaggio o corpi proteici, delle cellule parenchimatiche. Tali proteine, denominate proteine di riserva, subiscono proteolisi durante la germinazione del seme liberando amminoacidi, ammoniaca e scheletri di carbonio per le piantine in via di sviluppo (Duranti, 2006).

I cereali contengono quantitativi proteici relativamente ridotti se comparati ai legumi, con una media che va dal 10 al 15% in peso secco; metà di queste sono rappresentate da proteine di riserva.

1.1 I CEREALI

I cereali comprendono diverse specie di piante erbacee annuali coltivate per i loro frutti. I loro semi secchi (cariossidi) sono ricchi di amido e sono utilizzati nell'alimentazione umana o animale come sfarinati o prodotti ottenuti da sfarinati (pane, pasta, biscotti, polenta, cc). Oggi più della metà delle terre arabili del mondo è coltivata a cereali. L'importanza dei cereali deriva dal fatto di possedere alcune caratteristiche peculiari, prima fra tutte, quella di dare un prodotto secco (10-20% di acqua) concentrato, facilmente trasportabile e ad alto potere calorico con apprezzabile contenuto proteico, lipidico e di sali minerali adatto all'alimentazione umana. Un'altra importante caratteristica è l'ampia adattabilità ad ambienti molto diversi. Infatti alcune specie si sono adattate a climi temperati (specie-microtermi: frumento, orzo, avena, segale, tritale); altre specie si sono adattate a climi caldi e tropicali e sono caratterizzate da elevate esigenze termiche (specie-macrotermi: mais, sorgo, riso, miglio, panico ecc.). Poiché i cereali contribuiscono in maniera determinante a soddisfare le esigenze alimentari mondiali, ogni progresso in questo settore ha riflessi sull'intera produzione alimentare (Francesco Basso 2007).

Attualmente, accanto alla ricerca volta ad aumentare la produttività dei cereali, è in atto una parallela attività sperimentale a carattere tecnologico e biotecnologico con la finalità di migliorarne la qualità del prodotto da un punto di vista nutrizionale, dietetico e funzionale. Gli obiettivi di questa attività, perseguiti con l'ausilio di tradizionali e nuove biotecnologie da una parte e di innovativi processi tecnologici dall'altra, sono orientati verso l'ottenimento di materie prime con migliori caratteristiche nutrizionali e funzionali per ottenere prodotti finiti di elevata qualità sensoriale e nutrizionale/nutraceutica (Luigi Giardini 2012).

1.1.1 Caratteristiche botaniche e morfobiologiche

I cereali appartengono alla famiglia botanica delle graminacee o Poaceae. Tra essi si collocano anche due specie appartenenti ad altre famiglie: il grano saraceno (*Fagopyrum esculentum*, Moench), che è una poligonacea e la quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd.), chenopodiacea coltivata su limitate superfici delle Ande cilene e peruviane.

Alla specie delle graminacee appartengono piante con apparato radicale fascicolato, caratterizzato da radici primarie che hanno origine dalla germinazione delle cariossidi e da radici secondarie che si sviluppano successivamente. Il numero delle radici primarie può variare da 5 a 7 nel frumento, nell'avena, nell'orzo, nella segale e nel mais; il miglio, il panico, e il riso invece ne hanno una sola. Le radici secondarie costituiscono la parte preponderante dell'apparato radicale di tutte le specie sviluppandosi dai primi nodi del fusto fino a 2-3 cm sotto la superficie del terreno, ma a volte, come nel caso del mais, possono formarsi anche da nodi situati in superficie. Il fusto cilindrico e cavo è un culmo che presenta ingrossamenti, detti nodi, i quali dividono il culmo in internodi, il cui numero varia in base alla specie. Dai nodi basali si originano i culmi secondari, detti anche culmi di accestimento, il cui numero varia in funzione della specie, della varietà delle condizioni nutrizionali e della densità dell'investimento.

Le foglie sono costituite da una guaina, da una lamina, dalla ligula e dalle auricole. La ligula è una formazione membranacea che abbraccia il culmo; le auricole invece sono formazioni falciiformi poste alla base della lamina.

L'infiorescenza è in genere una spiga o spadice, una pannocchia o un racemo.

Il frutto o seme secco è una cariosside in cui distinguiamo l'embrione, gli involucri costituiti dal pericarpo del frutto saldato con la testa o spermoderma del seme, l'endosperma che comprende lo strato aleuronico di natura proteica e il tessuto parenchimatico amilaceo. Le caratteristiche delle cariossidi variano da specie a specie, sia nella forma che nella composizione. Il ciclo biologico dei cereali è

costituito da una serie di fasi che si distinguono in germinazione, accestimento, levata, fioritura e maturazione (Luigi Giardini 2012).

1.1.2 Esigenze di adattamento a condizioni ambientali sfavorevoli

Le esigenze dei cereali di interesse maggiore variano da specie a specie, particolarmente nei riguardi dei fattori climatici. All'interno di ogni specie è tuttavia ampio il grado di adattamento, per cui varietà diverse della stessa specie le possiamo trovare coltivate in ambienti anche tra loro notevolmente differenti. Un esempio è il caso dell'orzo che dalle zone predesertiche lo troviamo coltivato fino ai paesi scandinavi; un altro è il frumento la cui coltivazione si estende dalle zone equatoriali, a quelle presenti a elevate altitudini fino alle zone dei climi freddi.

In funzione delle loro esigenze termiche possiamo suddividere i cereali in due gruppi: microtermi e macrotermi. Al primo gruppo appartengono il frumento, l'orzo, l'avena, la segale e il triticale. Queste sono caratterizzate dal fatto che le loro cariossidi possono germinare a temperature poco sopra lo zero ma le piante che si sviluppano possono sopportare, fino alla fase che precede la levata, temperature di diversi gradi sotto lo zero. Questa caratteristica li rende adatti a essere seminati in autunno, affrontando i periodi più freddi dell'anno. Solo nei paesi nordici essi vengono seminati frequentemente alla fine dell'inverno. Il loro ciclo vegetativo si compie quindi, nelle nostre condizioni, normalmente nel periodo autunno-primavera. Per questo motivo vengono anche detti cereali autunno-primaverili o vernini. La loro resistenza al freddo è decrescente passando dalla segale, al frumento, all'orzo, all'avena. Decrescente nello stesso ordine è l'habitus invernale della pianta. Esiste tuttavia una variabilità notevole all'interno di ogni specie. Questi cereali vengono anche indicati come "cereali a paglia".

Il gruppo dei cereali macrotermi comprende il mais, il riso, il sorgo, il miglio, il panico. Le temperature minime per la germinazione delle cariossidi di queste specie si aggirano intorno ai 10 °C o più. Queste piante inoltre, richiedendo temperature crescenti dalla germinazione alla maturazione, hanno un ciclo colturale che

interessa nei climi temperati il periodo primavera-estate e pertanto vengono chiamati anche cereali estivi (Francesco tasso 2007)).

1.1.3 Importanza economica

Tra la fine del 2007 e gli inizi del 2008 i prezzi dei cereali in Italia mostrarono un notevole incremento, con variazioni mai verificatesi nella storia della cerealicoltura italiana: il prezzo del frumento duro dal giugno 2006 al giugno 2008 crebbe del 133%; allo stesso tempo aumentarono anche i prezzi del frumento tenero (+91%), del mais (+63%) e dell'orzo (+60%). Dopo questa repentina ascesa, i prezzi mostrarono una decisa tendenza al ribasso, in concomitanza con i raccolti 2008, con una fluttuazione imprevista ed imprevedibile per la maggioranza degli operatori. Eppure i due anni precedenti (giugno 2004-giugno 2006) erano stati contraddistinti da una fortissima stabilità e stagnazione dei prezzi, raggiungendo i livelli più bassi dell'ultimo ventennio. Gli andamenti del mercato sono particolarmente importanti perché modificano profondamente la redditività delle colture cerealicole in quanto la fluttuazione dei prezzi si riflette in una variazione proporzionale dei ricavi, sia per gli imprenditori agricoli sia per gli operatori della filiera. Tra il 2014 e il 2015 le intenzioni di semina dichiarate dai coltivatori hanno fatto registrare una contenuta diminuzione della superficie a seminativi (-1,3%). Si sono registrati pertanto decrementi delle superfici destinate a frumento tenero (-7,6%), mais da granella (-8%) e sorgo (-8,5%), mentre sono risultate in aumento le superfici a frumento duro (+2,9%), riso (+0,7%) e cereali minori, quali orzo (+3,6%), avena (+0,3%) e altri cereali (+10,5%). L'UE-28 nel 2013 ha prodotto 306 milioni di tonnellate di cereali (incluso il riso), raggiungendo il livello più elevato di produzione dopo il picco del 2008. Nel 2013 la produzione di cereali dell'UE-28 è risultata superiore a quella del 2012 di 20,9 milioni di tonnellate (+ 7,3 %). Quasi la metà (46,9 %) della produzione complessiva di cereali era rappresentata da frumento, mentre circa un quinto del totale era costituito da mais misto di granoturco (21,4 %) e un altro quinto da orzo (20,0 %). La Francia e la Germania sono di gran lunga i principali produttori

di cereali e di barbabietole da zucchero, avendo fornito insieme nel 2013 poco più della metà (51,9 %) del totale della produzione dell'UE-28 di barbabietole da zucchero e quasi i due quinti della sua produzione di cereali (37,6 %), (Fascarelli e Olivero 1993-2008).

1.1.4 Tecniche di coltivazione dei cereali

La coltivazione dei cereali è caratterizzata da notevole semplicità e facilità di meccanizzazione. Solamente nella coltivazione del riso si richiede una particolare accurata sistemazione del terreno. Le tecniche di lavorazione variano in funzione della natura del terreno, della precessione colturale, del grado di infestazione e delle specie infestanti. Tra i lavori principali, l'aratura è ancora oggi la modalità più diffusa nei terreni argillosi ed in quelli molto inerbiti, nonché in quelli con presenza di residui colturali. Negli ultimi anni il tema della lavorazione è stato profondamente modificato in relazione al contenimento dei costi di produzione, infatti si parla oggi di *minum tillage* riferendosi a tecniche di lavorazioni ridotte, realizzate con un unico passaggio di fresatrice al fine di predisporre il terreno per la semina; si parla anche di *zero tillage* quando non viene effettuata nessuna lavorazione e la semina viene eseguita con apposite macchine su terreno sodo in presenza di residui colturali. I problemi più significativi della tecnica colturale dei cereali interessano l'epoca, la densità e la profondità di semina, nonché gli interventi agronomici riguardanti la concimazione, l'irrigazione, il diserbo e la raccolta. A prescindere da questi fattori i passaggi fondamentali che si applicano generalmente a tutte le colture ma che possono essere differenti per alcune specie sono:

- *Avvicendamento*: consiste nella programmazione della successione delle colture che devono essere seminate o trapiantate sullo stesso appezzamento, in funzione del ruolo che le colture possono svolgere in termini di impatto sulla fertilità del terreno;

- *lavorazione del terreno*: serve essenzialmente a fare in modo che il seme venga accolto e messo in condizioni di germinare bene, quindi di fuoriuscire dal suolo e permettere l'ottimale sviluppo della piantina. Deve essere garantita una porosità tale da permettere un buon trattenimento dell'acqua ed essere contemporaneamente consentita un'ottimale presenza e circolazione di gas quali ossigeno e anidride carbonica ;
- *concimazione*: è sicuramente uno degli aspetti più fondamentali della tecnica colturale per l'ottenimento di apprezzabili rese unitarie; gli elementi comunemente usati sono *macroelementi* (azoto, fosforo, potassio, calcio, magnesio e zolfo) e *microelementi* (zinco, manganese, rame, boro e molibdeno);
- *semina*: passaggio che avviene con l'ausilio di diverse macchine seminatrici che rendono omogeneo lo spargimento delle sementi sulle superfici da coltivare;
- *irrigazione*: tutte le specie vegetali necessitano di questa fase, fondamentale per la germinazione e per ottenere una densità di crescita omogenea; ovviamente tale azione è resa possibile dalle precipitazioni atmosferiche, ma qualora ci sia scarsità di piogge è necessario ricorrere all'irrigazione meccanica;
- *azioni correttive contro parassiti o malattie patogene*: in molti casi durante il periodo dell'accrescimento ma anche di maturazione si va incontro a infestazioni da parte di parassiti e agenti patogeni di varia natura, di conseguenza per non compromettere la resa futura bisogna agire utilizzando tra i metodi meno invasivi possibili quello di sostanze che permettano di debellare l'infestazione;
- *raccolta*: fase finale del ciclo, avviene maggiormente in modo meccanico e in periodi e tempi diversi dati dal tipo di specie coltivata, dalle azioni meteorologiche, dagli interventi fatti sul terreno, dalle eventuali infestazioni e da tanti altri piccoli fattori.(Francesco Basso 2007).

1.1.5 Composizione e qualità nutraceutica dei cereali

I cereali sono composti per l'8-18% (mediamente il 12%) di **acqua**, in relazione alla zona, più o meno umida, in cui i cereali sono stati coltivati. Tra i requisiti che servono a stabilire il valore commerciale dei cereali, vi è infatti il grado di umidità (che in media non deve essere superiore al 14%) e il peso specifico apparente, che diminuisce all'aumentare della percentuale di acqua. I **glucidi** rappresentano mediamente il 72% del peso della cariosside. L'**amido** (60-68%) è il componente tecnologicamente più importante per la sua caratteristica di assorbire acqua. Le **proteine** ammontano mediamente al 12-18%, con valori minimi del 7%. La loro classificazione è in genere basata sulla solubilità in acqua, come mostrato in (tabella 1.1) e si distinguono in:

- **albumine:** rappresentano il 9-11% del contenuto proteico totale, sono proteine ad alto valore biologico, ricche in glutammina, leucina, prolina e lisina.
- **globuline:** costituiscono il 5-7% del contenuto proteico totale; sono anch'esse proteine nobili, localizzate quasi esclusivamente nel germe. Il loro contenuto in lisina, arginina, serina e cisteina è elevato.

Albumine e globuline sono entrambe proteine complete in amminoacidi essenziali ma, dato che si ritrovano nel germe e nel pericarpo, vengono allontanate durante la macinazione.

- **prolamine, gliadine, gluteline:** rappresentano la rimanente quota proteica (75-95%) e sono localizzate prevalentemente nell'endosperma. La composizione chimica di queste proteine (insolubili e di riserva) ha importanza ai fini nutrizionali e per l'attitudine alla panificazione. Infatti, le *gliadine* e le *gluteline*, a contatto con l'acqua, si uniscono con legami intermolecolari formando il **glutine**.

I **lipidi** (1,5-2%), presenti quasi esclusivamente nel germe, sono costituiti da gliceridi esterificati per 80-84% ad acidi grassi insaturi (oleico, linoleico, linolenico) e per circa il 13% a saturi, in particolare il palmitico.

I **Sali minerali** che rappresentano l'1,5-2% sono costituiti da fosfato di Mg e K, sali di Ca, Fe, S, Cu, Zn ecc. Negli ultimi anni studi epidemiologici hanno associato

il consumo dei cereali integrali e dei loro derivati ad una ridotta incidenza di malattie cardiovascolari, diabete e cancro. E' stato inoltre recentemente dimostrato come siano gli effetti additivi e/o sinergici dei diversi composti bioattivi a determinare l'effetto protettivo degli alimenti piuttosto che quello dei loro singoli componenti. Nonostante le linee guida della nutrizione pongano i cereali e i loro derivati alla base della piramide alimentare, gli effetti salutistici del consumo di granella sono stati molto meno indagati rispetto a quelli dei prodotti ortofrutticoli. Questi effetti salutistici sono stati attribuiti a composti biologicamente attivi (nutraceutici), tipici dei cereali e presenti nelle diverse componenti della cariosside dal pericarpo, al germe, all'endosperma. Sembra che il principale effetto positivo relativo al consumo di cereali integrali sia legato alla loro capacità antiossidante totale (Cappelli-Vannucchi). E' noto, infatti, che l'assunzione di antiossidanti mediante la dieta possa determinare un rafforzamento della barriera di protezione cellulare nei confronti dei fenomeni ossidativi. Uno studio condotto da ADOM e LIU (2002) ha messo a confronto la capacità antiossidante totale della granella integrale di diverse specie cerealicole (mais, frumento, avena, riso) evidenziando che il frumento si trova al secondo posto, preceduto dal mais.

La maggior parte dei composti antiossidanti è costituita da fenoli, tocoferoli e carotenoidi. La granella dei cereali è ricca in acidi fenolici le cui quantità totali possono arrivare a 500 mg/kg, mentre i flavonoidi sono presenti in piccole quantità. I cereali inoltre rappresentano per l'uomo la fonte principale di Lignani introdotti con la dieta. I Lignani sono anch'essi potenti antiossidanti che esercitano azione anticancerogena riducendo la produzione di ROS (*reactive oxygen species*) da parte delle cellule tumorali e di quelle del sistema immunitario. Anche i fitosteroli, sebbene rappresentino componenti minori della frazione lipidica dei cereali, possono avere degli effetti benefici per salute abbassando il livello di colesterolo ematico e riducendo il rischio di patologie croniche. Sebbene i cereali siano una delle principali fonti di folati nella dieta, scarsi sono i dati sul contenuto e sulle forme presenti in questo gruppo di alimenti. Nella dieta del nostro paese i cereali rappresentano un'importante fonte di folati da vegetali contribuendo per più del 30% alla quota giornaliera. La ricchezza in fibra dei cereali allo stato grezzo riduce notevolmente la tendenza al sovrappeso in quanto la fibra conferisce di per sé senso

di sazietà, oltre a contenere abbondantemente vitamine del gruppo B che favoriscono il metabolismo dei carboidrati. Nella storia dell'uomo questi alimenti sono sempre stati utilizzati dalle popolazioni con un netto aumento della resistenza alla fatica e con un ottimo effetto equilibrante del sistema nervoso: i cereali integrali costituiscono, dunque un alimento essenziale durante la gravidanza, l'allattamento, la crescita e contro il surmenage psicofisico, l'anemia, la stipsi, la diverticolosi, le varici degli arti inferiori, l'aterosclerosi, il diabete senile, l'ipercolesterolemia ecc. Gli alimenti cerealicoli più appropriati al fine di mantenere in buone condizioni l'intestino, il fegato, il pancreas e con essi tutto l'organismo sono proprio quelli "rustici", meno raffinati, meno elaborati e additivati, cioè quelli che a prima vista possono sembrare poco appetibili ma che, se correttamente cucinati e adeguatamente masticati, diventano elementi essenziali per una sana alimentazione. La quantità media di cereali integrali da consumare quotidianamente varia per l'uomo adulto fra i 200 e i 300 g (di peso secco), suddivisi fra pane, pasta, riso, polenta, segale ecc. Chiaramente questa dose va intesa in modo elastico, a seconda del consumo calorico individuale e delle condizioni di nutrizione. Secondo alcuni dietologi sarebbe più salutare non mangiare pasta e pane sia a pranzo che a cena ma concentrare il consumo degli amidi in un unico pasto (meglio a mezzogiorno), per sfruttare la loro potenzialità energetica, consumando la sera prevalentemente proteine. Tali dissociazioni alimentari, anche se non fondamentali per conservare la salute e non adatte a tutti i palati, possono apportare vantaggi alla digestione gastrica, all'equilibrio fermentativo intestinale, alla lucidità mentale postprandiale e al controllo del peso corporeo Francesco Basso (2007).

Tabella 1.1 classificazione delle proteine dei chicchi di cereali in base alla diversa solubilità (Patrizia cappelli, Vanna Vannucchi-chimica degli alimenti zanichelli).

TIPO DI PROTEINA	CARATTERISTICHE DI SOLUBILITA'
<i>albumine</i>	Solubili in soluzioni in acqua
<i>globuline</i>	Solubili in soluzioni saline
<i>prolammine</i>	Solubili in soluzione acquosa con elevato tenore di etanolo (70%)
<i>gluteline</i>	Solubili in soluzioni acide (acido acetico) o alcaline diluite
<i>Gluteline a elevata massa molecolare</i>	Insolubili nelle precedenti soluzioni

1.2 LEGUMINOSE DA GRANELLA

Le leguminose da granella comprendono un gruppo di piante erbacee annuali aventi caratteristiche botaniche, agronomiche e nutrizionali abbastanza simili tra di loro. Esse rivestono notevole importanza alimentare perché capaci di fornire granella altamente proteica che occupa un posto di grande rilievo nell'alimentazione umana e degli animali domestici, tanto da essere denominate piante "proteaginose". Sia in passato che nell'epoca moderna i semi delle proteaginose costituiscono un alimento fondamentale capace di soddisfare le esigenze alimentari di molte popolazioni, demograficamente dense ed economicamente depresse (Cina, India, Messico, Brasile), grazie al bilanciamento degli amminoacidi presenti nei loro semi. Le leguminose da granella sono quasi tutte originarie del vecchio mondo, fatta eccezione per i generi *phaseolus* e *lupinus* provenienti dal nuovo mondo e per la *soia* di origine asiatica. La loro coltivazione risale a tempi molto lontani come confermano i ritrovamenti archeologici di semi di diverse specie di leguminose che, in condizioni ambientali ottimali (temperatura e umidità), si conservano bene per molti anni. Durante il loro processo di domesticazione le leguminose da granella hanno subito modificazioni comuni a molte specie. Principalmente quelle coltivate oggi differiscono da quelle selvatiche per la ridotta ramificazione, per la presenza di foglie più numerose, per la struttura nana, per l'aumento del numero e delle dimensioni dei semi, per il passaggio da forme perenni a forme annuali, per la riduzione o totale assenza di principi tossici antinutrizionali nei semi e per la riduzione della deiscenza e del periodo di dormienza.

Grazie alla proprietà di fissare l'azoto atmosferico, per la presenza di microorganismi azotofissatori simbiotici, le proteaginose sono piante in grado di aumentare il livello di fertilità del terreno; questo risulta di particolare importanza nelle zone ove la scarsità dei prodotti industriali rende i concimi azotati molto costosi o di difficile reperimento.

Nei paesi economicamente più sviluppati le leguminose da granella hanno perduto la loro tradizionale importanza, soprattutto nell'alimentazione umana, per la tendenza a consumare alimenti proteici più pregiati come quelli di origine animale. I difetti legati al consumo delle leguminose da granella sono vari come il gusto che tende a stancare dopo un uso prolungato e il fatto che la natura delle sostanze

proteiche non è la migliore dal punto di vista biologico, contenendo bassi valori di alcuni amminoacidi essenziali come *cisteina* e *metionina*. Va precisato inoltre che quasi tutti i legumi, anche se in misura diversa, danno luogo durante la digestione ad una fastidiosa flatulenza intestinale derivata da certi carboidrati che fermentano nel tratto ileo-cecale generando gas. In molti semi di leguminose sono contenute anche sostanze tossiche (alcaloidi nel lupino; nematossine nella cicerchia) o antimetaboliche (principi antitripsinici nella soia, glucosidi, saponine, tannini, ecc.). Molti di questi inconvenienti si eliminano con semplici trattamenti come la cottura, la tostatura, l'ammollo ecc. Realisticamente il successo delle proteaginose può dipendere dall'utilizzo di semi migliorati con moderne tecnologie di coltivazione biologica e di conservazione del prodotto (Francesco Basso 2007).

1.2.1 Caratteristiche botaniche

La famiglia delle Leguminosae, dopo quella delle Compositae, rappresenta il gruppo di Dicotiledoni più vasto e complesso esistente sulla terra, con circa 700 generi ed oltre 18.000 specie diverse di piante a portamento erbaceo, arbustivo, arboreo o lianoso sparse un po' in tutti i continenti. Per le conseguenze che il fenomeno comporta sul piano agronomico è interessante ricordare che le leguminose, con riferimento alla caratteristiche della germinazione, possono essere suddivise in due grandi gruppi: a germinazione epigea ed ipogea. Nel primo i cotiledoni racchiusi ordinariamente all'interno del tegumento vengono sollevati sopra la superficie del terreno per azione dell'asse ipocotile che si raddrizza e si allunga rapidamente. Si comportano in questo modo il fagiolo e le phaseolae in genere, che possono considerarsi leguminose macroterme a semina primaverile obbligata. Nel secondo gruppo, poiché l'ipocotile resta a sviluppo limitato i cotiledoni rimangono nel terreno, all'interno del tegumento, mentre l'epicotile, nettamente differenziato, si allunga fino alla superficie del suolo incaricandosi di portare alla luce le prime due foglioline vere (Luigi Gardini 2012).

1.2.2 Importanza economica

Le leguminose da granella, soia esclusa, sono presenti in tutto il mondo occupando una superficie di circa 75 milioni ettari, con una produzione di circa 65-70 milioni di t. Questi valori sono in continuo aumento per effetto dei continui miglioramenti nelle tecniche colturali. Il miglioramento delle rese si è verificato particolarmente in Asia, con il 53% della superficie mondiale. In rapporto alla estensione delle differenti specie coltivate, il fagiolo occupa il primo posto con il 38% della superficie investita a leguminose da granella secca, cui seguono il cece con il 16%, il pisello con il 9%, la lenticchia con il 5% e la fava con il 3%. Il restante 29% è composto da altre specie prese in considerazione dalle statistiche FAO ma che non sono di interesse ai fini del presente elaborato. Un esame della distribuzione mondiale delle specie di maggiore interesse, soprattutto sotto il profilo dell'alimentazione umana, rivela che la coltivazione del fagiolo, oltre all'Asia, interessa fortemente l'America del sud; quella del pisello soprattutto l'Europa e l'Asia mentre il cece e la lenticchia sono diffusi prevalentemente in Asia. In Italia fino al 2011 erano 69000 gli ettari coltivati a leguminose, con una resa di 1,5 milioni di q. Di questi solo 12000 ettari riguardavano la Toscana con una resa di 215000 q di prodotto. Da notare che l'Italia sino al 2010 ha importato fagioli, soprattutto secchi, per oltre 16000 t con un controvalore di 23,5 milioni di euro e un prezzo medio di prodotto confezionato all'ingrosso pari a 1,51 euro. Il considerevole import è da addebitare a una serie di fattori che hanno reso il nostro paese molto debole per tale tipologia di prodotto come una filiera produttiva strutturalmente inadeguata rispetto a un'offerta di fagioli secchi nostrani frammentata e incostante (Fascorelli e Olivero 2009). A partire dagli anni 50 le leguminose da granella hanno avuto nel nostro paese una regressione continua delle superfici coltivate in relazione al minore utilizzo della granella nell'alimentazione umana (sostituita da alimenti

più nobili) e in quella degli animali (a causa della consistente riduzione del patrimonio zootecnico), oltre al ridotto reddito per gli agricoltori. Com'è noto, gli scenari agricoli nell'Unione europea e nel nostro paese tendono sempre a cambiare in quanto l'orientamento sulla destinazione delle colture è sempre più rivolto verso quelle a destinazione non alimentare, a ridotto input di materie prime non rinnovabili e praticate con sistemi colturali il più possibile conservativi nei riguardi del suolo. In questi scenari alcune leguminose da granella sono possono fornire un contributo essenziale all'agricoltura sostenibile e rispettosa dell'ambiente, in virtù di alcune loro importanti caratteristiche quali: l'arricchimento del suolo in azoto atmosferico in quanto ricchi di simbionti azoto-fissatori, copertura del suolo ai fini protettivi, fonte di proteine ad alto valore biologico. Realisticamente una ripresa delle colture proteaginose dipende dall'attivazione delle relative filiere e dalla loro competitività in termini di reddito, (*European review of Agricultural economics* 2012).

1.2.3 Tecniche di coltivazione

Le leguminose da granella, soia esclusa, sono presenti in tutto il mondo occupando una superficie di circa 75 milioni ettari, con una produzione di circa 65-70 milioni di t. Questi valori sono in continuo aumento per effetto dei continui miglioramenti nelle tecniche colturali. Il miglioramento delle rese si è verificato particolarmente in Asia, con il 53% della superficie mondiale. In rapporto alla estensione delle differenti specie coltivate, il fagiolo occupa il primo posto con il 38% della superficie investita a leguminose da granella secca, cui seguono il cece con il 16%, il pisello con il 9%, la lenticchia con il 5% e la fava con il 3%. Il restante 29% è composto da altre specie prese in considerazione dalle statistiche (FAO) ma che non sono di interesse ai fini del presente elaborato. Un esame della distribuzione mondiale delle specie di maggiore interesse, soprattutto sotto il profilo dell'alimentazione umana, rivela che la coltivazione del fagiolo, oltre all'Asia, interessa fortemente l'America del sud; quella del pisello soprattutto l'Europa e l'Asia mentre il cece e la lenticchia sono diffusi prevalentemente in Asia. In Italia

fino al 2011 erano 69000 gli ettari coltivati a leguminose, con una resa di 1,5 milioni di q . Di questi solo 12000 ettari riguardavano la Toscana con una resa di 215000 q di prodotto. Da notare che l'Italia sino al 2010 ha importato fagioli, soprattutto secchi, per oltre 16000 t con un controvalore di 23,5 milioni di euro e un prezzo medio di prodotto confezionato all'ingrosso pari a 1,51 euro. Il considerevole import è da addebitare a una serie di fattori che hanno reso il nostro paese molto debole per tale tipologia di prodotto come una filiera produttiva strutturalmente inadeguata rispetto a un'offerta di fagioli secchi nostrani frammentata e incostante. A partire dagli anni 50 le leguminose da granella hanno avuto nel nostro paese una regressione continua delle superfici coltivate in relazione al minore utilizzo della granella nell'alimentazione umana (sostituita da alimenti più nobili) e in quella degli animali (a causa della consistente riduzione del patrimonio zootecnico), oltre al ridotto reddito per gli agricoltori. Com'è noto, gli scenari agricoli nell'Unione europea e nel nostro paese tendono sempre a cambiare in quanto l'orientamento sulla destinazione delle colture è sempre più rivolto verso quelle a destinazione non alimentare, a ridotto input di materie prime non rinnovabili e praticate con sistemi colturali il più possibile conservativi nei riguardi del suolo. In questi scenari alcune leguminose da granella possono fornire un contributo essenziale all'agricoltura sostenibile e rispettosa dell'ambiente, in virtù di alcune loro importanti caratteristiche quali: l'arricchimento del suolo in azoto atmosferico in quanto ricchi di simbionti azoto-fissatori, copertura del suolo ai fini protettivi, fonte di proteine ad alto valore biologico. Realisticamente una ripresa delle colture proteaginose dipende dall'attivazione delle relative filiere e dalla loro competitività in termini di reddito (Luigi Giardini 2010).

1.2.4 Valore nutrizionale della granella delle proteaginose

Il valore nutrizionale della granella delle proteaginose risiede nell'elevato contenuto proteico, glucidico e, a volte, lipidico. In particolare le proteine variano da un minimo del 18% in alcune varietà di cece ad un massimo del 44,3% nei lupini secchi. Il tenore in lipidi invece va dal 2% dei piselli secchi al 16,5% dei lupini secchi. L'apporto calorico varia da 325 Kcal/100 g di granella a 407 Kcal. E' noto che la distribuzione di amminoacidi essenziali nelle proteine non è così completa ed equilibrata come quella delle proteine animali. In particolare la lisina abbonda in quasi tutte le leguminose alimentari, mentre gli amminoacidi solforati (metionina e cisteina) insieme al triptofano sono presenti in quantità ridotta. Una situazione tipicamente opposta si verifica nei cereali che sono carenti in lisina ma abbastanza ricchi di amminoacidi solforati. Quindi associando il consumo di leguminose (fave, piselli, ceci, lenticchie, fagioli) a quello di cereali (frumento, riso, orzo, farro ecc.) si può ottenere una dieta sufficientemente equilibrata dal punto di vista degli amminoacidi essenziali, sali minerali ed altri nutrienti (Cappelli-Vannucchi, Zanichelli).

L'abbondanza di fibre alimentari presenti nei semi di leguminose favorisce inoltre la funzionalità dell'intestino, con vantaggiosi riflessi sul metabolismo del colesterolo. E' interessante notare come la complementarietà tra cereali e legumi si ritrovi in alcuni piatti tipici della nostra tradizione come farro e fagioli, dove l'assenza di alcuni amminoacidi dei legumi viene sopperita con la presenza degli stessi nei cereali. I legumi sono alimenti molto ricchi in nutrienti essenziali in quanto presentano un contenuto in proteine 2-3 volte maggiore rispetto ai cereali, sono una buona fonte di alcune vitamine del gruppo A e C e di alcuni minerali; inoltre contengono polisaccaridi (amido e fibra) che esplicano importanti effetti fisiologici e metabolici svolgendo un ruolo protettivo verso alcune patologie dell'apparato digerente.

La qualità nutrizionale delle proteine dei legumi dipende essenzialmente da due fattori: la composizione amminoacidica e la digeribilità proteica, cioè la percentuale di proteine totali ingerite che viene idrolizzata dagli enzimi proteolitici dell'intestino e successivamente assorbita. La digeribilità delle proteine dei legumi è mediamente del 78-88% più bassa di quella delle proteine dei cereali e di

derivazione animale a causa della presenza di alcune frazioni proteiche resistenti alla degradazione da parte degli enzimi proteolitici, della struttura proteica compatta per la presenza di ponti disolfuro, delle interazioni con altri costituenti come tannini, fitati, fibra e dell'azione d'inibitori enzimatici. I legumi, hanno inoltre, un contenuto altamente significativo di molti minerali come ferro, potassio, fosforo, sodio, magnesio e calcio. La digeribilità proteica di alcuni legumi varia da 61% della lenticchia all'81% del cece, valori che risultano nettamente inferiori a quelli registrati per la carne e per altri alimenti (90-100%) (Francesco Basso 2007). Per quanto riguarda i carboidrati essi rappresentano il 60% del peso secco dei semi e sono costituiti da carboidrati complessi o polisaccaridi (amido e fibra) e da zuccheri. L'amido costituisce il 40-50% dei legumi secchi ed è rappresentato da due frazioni, amilosio e amilopectina, in rapporto 1 a 3. In passato l'amido era considerato totalmente degradato a glucosio dalle amilasi intestinali e come tale completamente assorbibile a livello intestinale. In effetti è costituito da frazioni che sono digerite con velocità diversa e, contenendo una frazione che resiste all'azione idrolitica delle amilasi intestinali (amidoresistente), non viene del tutto assorbito dall'intestino comportandosi come fibra. La percentuale delle diverse frazioni varia notevolmente in relazione ai trattamenti termici: nei semi crudi il 20-40% è costituito da amido resistente e come tale non è utilizzato dall'organismo; tale frazione viene notevolmente ridotta dai trattamenti termici che portano ad un aumento della digeribilità dell'amido. I legumi sono comunque un'eccezionale fonte di fibra alimentare, sia insolubile che solubile, quest'ultima in quantità più elevata nei fagioli. La prima è costituita essenzialmente da cellulosa ed emicellulosa che esplicano un'azione fisiologica a livello intestinale stimolandone la motilità; la seconda invece è costituita essenzialmente da pectine che arrivano inalterate al colon, dove subiscono un processo di fermentazione ad opera della microflora presente con produzione di acidi grassi (acetico, propionico, butirrico). Questi costituenti intervengono con meccanismi diversi nella protezione della mucosa epiteliale del colon e nel metabolismo dei lipidi e dei glucidi contribuendo all'abbassamento del livello di colesterolo e glucosio plasmatici. I carboidrati complessi dei legumi svolgono effetti positivi sulla salute determinando un basso indice glicemico, svolgendo un'azione protettiva verso l'insorgenza del cancro del

colon retto, controllando il transito intestinale degli alimenti con conseguente controllo dell'obesità. Un altro effetto protettivo è stato registrato nei confronti delle malattie cardiovascolari per la capacità di abbassare il colesterolo nel plasma; quest'effetto è stato studiato nella soia ed è stato osservato anche nei ceci. Gli zuccheri sono costituiti oltre che da tracce di glucosio e di fruttosio, essenzialmente da saccarosio e da composti specifici di questa classe di alimenti che sono gli α -galattosidi come raffiniosio, stachiosio e verbascosio, responsabili della flatulenza. I lipidi sono presenti in quantità molto modesta (1-2%) tranne che nel cece dove raggiungono il 6%. Sono costituiti per il 60% da acidi grassi polinsaturi e contengono piccole quantità di fitosteroli. Il contenuto in vitamine dei legumi è apprezzabile rappresentando una buona fonte di tiamina, niacina, biotina, e in misura ridotta di riboflavina. La vitamina C è presente solo nei legumi freschi, mentre le vitamine liposolubili sono presenti in quantità modeste. I tocoferoli sono presenti in quantità apprezzabile nei ceci mentre la vitamina A è presente nei legumi freschi (Cabras-Martelli, Piccin).

1.2.5 Fattori antinutrizionali della granella

L'elevato potenziale nutrizionale dei semi delle leguminose è spesso limitato dalla presenza di un gruppo eterogeneo di composti di natura proteica e non proteica noti come fattori "antinutrizionali" a causa dei loro effetti potenzialmente tossici o dannosi. I fattori antinutrizionali di natura proteica sono le lectine, gli inibitori enzimatici delle proteasi (tripsina e chimotripsina) e dell' α -amilasi; quelli di natura non proteica sono rappresentati da fenoli semplici e complessi (flavonoidi, chinoni, isoflavani e tannini), fitati, α -galattosidi, glucosidi pirimidinici, alcaloidi e saponine. I fattori antinutrizionali di natura proteica possono essere inattivati con il trattamento termico che precede il consumo dei legumi mentre quelli di natura non proteica (in parte termostabili) possono essere inattivati mediante altri trattamenti. Va precisato, comunque, che gli effetti negativi di alcuni fattori antinutrizionali possono essere osservati solo in caso vengano assunti in grande quantità e che la loro presenza può avere effetti significativi in condizioni di malnutrizione o di nutrizione marginale.

Attualmente l'attenzione è rivolta alla conoscenza della concentrazione dei fattori antinutrizionali all'interno del seme, alle strategie mirate alla riduzione del loro contenuto nel seme o ai possibili effetti benefici di alcuni di questi fattori al di sotto dei livelli di tossicità. Il loro contenuto dipende da numerosi fattori fra cui la specie, la varietà, lo stato di maturazione ecc. Infatti il contenuto di lectine aumenta durante lo sviluppo del seme raggiungendo il massimo livello immediatamente prima della maturazione. Le lectine presenti nella maggior parte dei semi di leguminose sono contenute in quantità variabile da 0,2 a 4% del peso secco. Poiché non sono degradate nel corso della digestione gastrointestinale, si possono legare alla porzione glucidica di recettori glicoproteici presenti nell'intestino interferendo con l'assorbimento di diversi nutrienti o causando iperplasia delle cellule intestinali. L'assorbimento di tali sostanze può inoltre causare effetti sul sistema immunitario ed endocrino (concentrazione d'insulina e glucagone nel sangue) e sul metabolismo in generale. Altri anti-nutrienti di natura proteica contenuti nei legumi sono gli inibitori enzimatici, soprattutto quella delle proteasi (inibitori della tripsina) e delle α -amilasi. La loro proprietà di formare complessi stabili con proteine ed amido unitamente a quella di inibire enzimi proteolitici e amilolitici è alla base della riduzione della digeribilità osservata. Molto diffuse nei legumi sono anche le saponine (così definite per causare la formazione di schiume stabili in soluzioni acquose). Questi composti presentano un'attività emolitica dovuta all'interazione con il colesterolo, ma anche antitumorale e fungicida. Da tutto ciò risulta evidente che l'utilizzo dei legumi per la nutrizione umana richiede una serie di interventi migliorativi atti alla rimozione dei componenti indesiderati (Cabras-Martelli, Piccin).

1.2.6 Utilizzazione della granella

Tutte queste colture hanno in comune l'organo utilizzato, costituito dal seme, ordinariamente consumato allo stato secco. I semi secchi vengono mangiati dopo cottura, sovente previo rigonfiamento in acqua per agevolarne la cottura stessa, il quale concorre ad eliminarne i principi antinutrizionali. I semi tuttavia vengono utilizzati anche allo stato fresco, estratti dal legume quando sono ancora più o meno immaturi; questa modalità di consumo è andata largamente estendendosi in Italia nonostante la drastica riduzione del consumo di granella. I semi secchi vengono anche utilizzati come prodotti germinati o fermentati in modo da essere esenti da inibitori di proteasi, da possedere un alto contenuto di vitamine o di proteine facilmente digeribili.

Tra le tecnologie moderne impiegate per il loro utilizzo assumono un certo rilievo la conservazione in scatola dei semi secchi, previa sterilizzazione e cottura del prodotto, nonché la preparazione di sfarinati, concentrati ed isolati proteici da destinare all'alimentazione umana. Di particolare importanza risulta l'impiego dei sottoprodotti (panelli) dell'industria olearia dei semi di soia nell'alimentazione animale.

A parte la notevole conservabilità, una caratteristica peculiare del seme delle leguminose da granella è costituita dall'elevato contenuto in sostanze proteiche che risulta tuttavia variabile sia in dipendenza della specie che nell'ambito della stessa specie. L'elevata dotazione proteica ne determina il loro valore biologico e spiega l'antico e vasto impiego che ne è stato fatto nell'alimentazione umana e in quella animale. I semi di alcune specie quali il lupino e la soia contengono anche un'elevata percentuale di grassi di ottimo valore alimentare. Alcune caratteristiche condizionano però l'impiego dei semi di leguminose nell'alimentazione umana. La composizione amminoacidica delle proteine risulta infatti carente in amminoacidi solforati (*cisteina* e *metionina*) e triptofano, il contenuto dei quali è, in media, inferiore alle esigenze standard indicate dall'organizzazione mondiale della Sanità. Tale carenza può essere però eliminata con un'appropriata dieta alimentare che prevede un apporto bilanciato di proteine di cereali e di proteine di leguminose, in un rapporto complementare del 50% per ciascuna fonte rispetto all'apporto proteico complessivo. Anche se la cottura aumenta la digeribilità delle proteine per una

presumibile inattivazione degli inibitori della tripsina e delle emoagglutinine, gli effetti sono assai variabili per cui è auspicabile indirizzare la ricerca per migliorare gli aspetti nutrizionali della granella delle leguminose. Le leguminose da granella, oltre che per i semi, sono apprezzate anche per la costituzione di erbai, per la produzione di foraggio fresco o di sostanza verde da sovescio. A esse, come peraltro alle leguminose in genere, sin dall'antichità è stata riconosciuta una notevole importanza dal punto di vista squisitamente agronomico, ai fini del miglioramento e mantenimento della fertilità del terreno. Questo ruolo è da attribuire alla capacità di fissazione simbiotica dell'azoto atmosferico e al fatto che alcune di esse si sono rese notoriamente benemerite come insostituibili colture da rinnovo (Francesco Basso 2007).

1.4 LE PROTEINE

Le **proteine** o **protidi** sono composti azotati ad elevato peso molecolare che rappresentano i costituenti fondamentali del protoplasma cellulare e, in genere, degli organismi. Esse hanno grandissima importanza non solo biologica ma anche alimentare. Nel corpo umano rappresentano il 16-18% del peso totale e tutte contengono carbonio (45-55%), idrogeno (6-8%), ossigeno (19-25%) ed azoto (14-20%, in media 16%). Molto spesso contengono zolfo, talora fosforo, ferro ed altri elementi (manganese, rame, iodio, zinco, ecc.), (Cappelli-Vannucchi, Zanichelli). L'elemento caratteristico delle proteine è rappresentato dall'azoto che manca nei carboidrati e nei lipidi. Il contenuto proteico negli alimenti è molto variabile, come si vede dalla (**tabella 1.4**), . Il proteoma, cioè l'insieme delle proteine che costituiscono il corpo umano è oggetto di continui studi. Uno degli obiettivi primari di questi studi è quello di comprendere sempre più i sistemi strutturali tridimensionali delle proteine in modo da individuare i punti più vulnerabili all'attacco dei farmaci. Le macromolecole proteiche, il cui p.m va da 5000 a più di un milione, sono costituite da un minimo di 50 amminoacidi a un massimo di 500 e in alcuni casi oltre. Catene più corte vengono chiamate peptidi (oligopeptidi, con un numero di amminoacidi minore o uguale a 10, o polipeptidi con 10-50 amminoacidi). Per la loro grande varietà qualitativa, per la dinamicità delle loro strutture (gli atomi sono in continuo movimento fluttuante) e per la capacità che hanno di legarsi in modo selettivo ad altre molecole, svolgono un numero molto elevato di compiti (Cabras-Martelli, Piccin):

- modulano l'espressione dei geni (repressori) e intervengono nella duplicazione, trascrizione e traduzione del DNA;
- regolano il metabolismo, come enzimi (se ne conoscono migliaia) e come ormoni (insulina, glucagone, STH-somatotropico Hormone-ecc.);
- trasportano svariate molecole attraverso i liquidi circolanti (emoglobina, apolipoproteine, RBP-Retention Binding Protein-ecc.) e attraverso le membrane cellulari ("pompe" e "canali proteici" specifici attraverso i quali molti ioni e molecole entrano nella cellula);

- intervengono nella coagulazione del sangue (fibrinogeno, protrombina);
- proteggono l'organismo dalle infezioni (anticorpi);
- danno luogo a strutture contrattili (actina, miosina ecc);
- Partecipano alla generazione e alla trasmissione degli impulsi nervosi (opsine, recettori dell'acetilcolina ecc.);
- Costituiscono la struttura dei tessuti di sostegno animali (collagene, cheratina, elastina ecc.);
- Rappresentano forme di deposito di principi nutritivi a cui attingono l'embrione animale o vegetale oppure il lattante (ovoalbumina, caseina, gliadina, zeina ecc.).

Le proteine alimentari sono costituite da tutte le categorie funzionali sopra elencate e si trovano in quantità più o meno significative nella quasi totalità degli alimenti. Ne sono completamente privi lo zucchero, gli oli, le bevande analcoliche (cola, acqua tonica, spuma ecc.). Rivestono una certa importanza, dal punto di vista nutritivo, le proteine delle masse muscolari (carne e pesce) costituite per circa il 40% da actina e miosina, e quelle di deposito: proteine dell'uovo, del latte, dei semi (**cereali e legumi**). Talvolta gli alimenti possono contenere sostanze proteiche che svolgono un ruolo negativo nei confronti dell'organismo, tra questi:

- **fattori antinutrizionali**, inattivati con la cottura, per esempio le lectine, proteine con potere emoagglutinante presenti in molti vegetali soprattutto nelle leguminose e gli inibitori degli enzimi (per esempio fattori antitriptici quali ovoucoide o gli inibitori dell'amilasi presenti nella cariosside nel frumento);
- **allergeni**, come talvolta possono risultare le proteine del latte vaccino, dell'uovo, dei crostacei e dei molluschi, delle noci e delle arachidi responsabili in individui sensibili, dello scatenarsi di reazioni allergiche, che vanno da semplici effetti istaminici a disturbi più gravi (difficoltà respiratorie, shock anafilattico);

- **tossine**, prodotte dai microrganismi contaminanti oppure contenute in piante o animali (tossina botulinica, ricina del seme di ricino ecc.)

Le proteine costituiscono anche un'anomala classe di agenti patogeni definiti prioni, responsabili di alcune malattie degenerative del sistema nervoso tra cui lo scrapie degli ovini, la BSE o morbo della "mucca pazza" e altre patologie simili (Cappelli-Vannucchi,Zanichelli).

Tabella 1.4. Contenuto generale proteico di alcuni alimenti(Cabras-Martelli,Zanichelli).

Farina di frumento tipo "00"	11,0%
Pane di tipo integrale	7,5%
Pasta di semola cruda	10,9%
Fagioli freschi crudi	10,2%
Lenticchie secche crude	22,7%
Soia secca	36,9%
Patate bollite	1,8%
Carne bovina	20,5%
Carne di pollo petto	23,3%
Prosciutto crudo	26,9%
Merluzzo e nasello fresco	17,0%
Latte vaccino intero	3,3 %
Formaggio grana	33,9%

1.4.1 Classificazione delle proteine

Le proteine possono essere classificate secondo vari criteri:

- in base alla funzione, rispetto ai numerosi compiti svolti, già presi in considerazione, si parla di: enzimi, ormoni, proteine di trasporto, di deposito, di struttura ecc.;
- in base alla forma, a sua volta si possono suddividere in due grandi categorie:
 - **proteine fibrose**, di origine animale, con prevalente funzione meccanica (cheratina, collagene, elastina, fibrina, actina, miosina, ovomucina);
 - **proteine globulari** (tutte le altre).
- In base alla combinazione chimica, si distinguono in:
 - **Proteine semplici** che sono quelle composte esclusivamente da α -amminoacidi; la composizione elementare di queste proteine è regolare: C 50%, O 23%, N 16%, H 7%, S max 3%;
 - **Proteine coniugate** che in natura sono le più abbondanti; queste, oltre alle catene polipeptidiche, contengono gruppi prostetici, non proteici, legati o no covalentemente. Le proteine coniugate si possono considerare le più “evolute” dal punto di vista funzionale in quanto è proprio in seguito all’introduzione dei gruppi prostetici che diventano idonee a esplicare la loro azione biologica.
- In base alle proprietà chimico-fisiche e alla loro solubilità, si differenziano:
 - **Protammine:** non contengono amminoacidi solforati e aromatici e sono più ricche di azoto rispetto ad altre proteine per il l’elevato contenuto in *arginina* e *istidina*. Sono basiche, solubili in acqua e associate agli acidi nucleici (istoni). Le protammine non coagulano al calore;
 - **Albumine:** sono spesso associate alle globuline ricche di amminoacidi solforati e aromatici. Le troviamo nel sangue, nel latte

e nelle uova. Nei vegetali sono soprattutto presenti nei semi, sono solubili in acqua e coagulano al calore (sieroalbumina, lattoalbumina, ovoalbumina ecc.);

- **Globuline:** importanti proteine di riserva nei vegetali, largamente distribuite però anche negli alimenti di origine animale (latte, uova, carne), sono debolmente acide, solubili in soluzioni saline diluite a pH neutro, coagulano al calore (ovoglobulina, sieroglobulina, fibrogeno, globuline vegetali);
- **Prolammine o gliadine:** sono contenute nell'endosperma dei semi. Hanno alto contenuto in *prolina* e in *acido glutammico* e sono povere in *arginina*, *istidina* e soprattutto in *lisina*. Esempi sono la *gliadina* del frumento e della segale che associata alla *glutelina* forma il *glutine*, molto importante nel processo di panificazione e pastificazione, l'intolleranza congenita alla *gliadina* è la *celiachia*. Sono insolubili in acqua ma solubili in alcool etilico al 70% (gliadina del frumento, zeina del mais);
- **Glutelina:** nei semi sono associate alle gliadine, contengono lisina e triptofano, sono insolubili in acqua e coagulano al calore. La glutelina del frumento è la *glutenina*.

Tutte quest'ultime citate sono proteine globulari; quelle fibrose vengono raggruppate nelle:

- Scleroproteine che hanno funzione meccanica, scarso valore nutrizionale e sono poco solubili in acqua; la solubilità migliora con alcali e acidi nonché con soluzioni saline. Il collagene del tessuto connettivo bollito in acqua e lasciato raffreddare gelatinizza. Le cheratine hanno un elevato contenuto in cistina e si trovano nei tessuti cornei (capelli, unghie, lana, penne, corna), (Cappelli-Vannucchi, Zanichelli).

1.4.2 Proprietà funzionali delle proteine

Oltre che per gli aspetti nutrizionali, le proteine hanno importanza fondamentale anche per l'aspetto fisico di molti alimenti: senza la matrice proteica, per esempio, pane, formaggio e carne sarebbero senza struttura.

La proprietà funzionale di una proteina è una specifica proprietà tecnologica che influenza l'aspetto fisico ed il comportamento di un prodotto alimentare in modo caratteristico e deriva dalla natura chimico-fisica della materia prima proteica. Sono le proprietà funzionali che consentono la possibilità di impiego in diverse formulazioni alimentari. Esse sono dipendenti dalle proprietà chimiche, quali grandezza molecolare, composizione amminoacidica, struttura e coniugazione, carica, reattività. Esempi di proprietà funzionali sono la solubilità, la dispersibilità, la capacità di legare l'acqua, le proprietà umettanti, le proprietà gelificanti, la coagulazione, la viscosità, l'elasticità, la coesione, la capacità emulsionante, le proprietà montanti e schiumogene, l'adsorbimento dei grassi e quello degli aromi. La capacità di una proteina di essere strutturata in modo di assumere una struttura fibrosa è una priorità funzionale molto importante. Si possono così strutturare molti materiali grezzi, a base fondamentale proteica, ma non solo come soia, arachidi, caseine, ecc. Con vari processi quali il fiber-spinning e l'extrusioncooking. Le proteine così strutturate, per esempio, quelle della soia, vengono ad assumere caratteristiche che le rendono utilizzabili nella formulazione di prodotti alimentari di nuova concezione (Cabras-Martelli, Piccin).

1.4.3 Aspetti nutrizionali e assorbimento

Molta attenzione si deve porre alla preservazione delle proteine durante i vari trattamenti che subiscono gli alimenti al fine di conservare il più possibile integro il loro valore nutrizionale. Con l'alimentazione giornaliera l'organismo assume proteine che forniscono gli amminoacidi in quantità variabili. Alcuni di questi sono sintetizzabili dal nostro organismo per i suoi fabbisogni nutrizionali, altri non lo sono e diventano, quindi, di apporto dietetico obbligatorio e regolare. Questi ultimi sono indicati come **amminoacidi essenziali** e non possono essere sostituiti da altri amminoacidi. Il nostro organismo necessita di una certa quantità minima di ciascun

amminoacido essenziale, cosicchè il valore nutrizionale o biologico delle proteine alimentari è determinato e limitato da quegli amminoacidi essenziali eventualmente presenti a livelli inferiori a quelli richiesti che vengono detti **amminoacidi limitanti**. Nel metabolismo delle proteine la legge dell'amminoacido limitante è di fondamentale importanza agli effetti della corretta nutrizione (in **Tabella 1.1.4.3** Indici nutrizionali proteici di alcuni alimenti ,Cappelli-Vannucchi,Zanichelli).

Somministrando un alimento proteico carente in uno degli amminoacidi essenziali, tutti gli altri presenti saranno utilizzati non in rapporto al loro effettivo quantitativo ma in rapporto all'amminoacido presente in minore quantità, quello limitante appunto. Saranno perciò utilizzati in misura inferiore a quanto teoricamente potrebbero esserlo. E' inoltre indispensabile che gli amminoacidi siano presenti contemporaneamente (**concetto di temporaneità**) onde la necessità di non introdurli con la dieta troppo frazionatamente nel tempo. Infatti, nel caso in cui un amminoacido venisse sorbito più lentamente o più tardi rispetto agli altri, si determinerebbe una perturbazione nell'equilibrio del bilancio dell'azoto. Ciò è particolarmente importante nel caso delle **proteine complementari**. In altre parole, l'integrazione reciproca delle varie proteine (per esempio quelle dei cereali e dei legumi in **figura 3.4.3**) è efficace solo quando le proteine **incomplete e complementari** sono ingerite insieme oppure separatamente ma entro un breve intervallo di tempo. Le proteine che contengono tutti gli amminoacidi essenziali nelle giuste proporzioni sono dette nobili e vi appartengono quasi tutte le proteine animali; le altre mancano di uno o più amminoacidi essenziali oppure li contengono in quantità inadeguata e vi appartengono quelle vegetali. Come si è già detto, i legumi sono carenti in *metionina* mentre i cereali in lisina e triptofano. L'essenzialità di un amminoacido varia comunque da specie a specie animale ed è in relazione a numerose influenze. Per esempio l'istidina è sintetizzabile in quantità sufficiente solo nell'adulto. Quando la composizione proteica quali-quantitativa è nota, è possibile trarre conclusioni circa il suo valore nutrizionale. Quest'ultimo può essere indicato in vari modi:

- **valore biologico (BV)**: è la percentuale di azoto che viene assorbito e utilizzato (trattenuto);
- **coefficiente di utilizzazione digestiva (CUD)**: è la percentuale di azoto degli

alimenti (ingerito) che viene assorbito;

- **utilizzo proteico netto (NPU):** è la percentuale di azoto degli alimenti (ingerito), che viene utilizzato (trattenuto);
- **NPV = BV x D** espresso in percentuale;
- **Indice proteico chimico (IPC) o punteggio chimico o indice qualitativo:** è il rapporto tra la percentuale di amminoacido limitante nella proteina in esame e la percentuale dello stesso amminoacido nella proteina di riferimento (uovo);
- **Rapporto efficienza proteica (PER):** è il rapporto tra l'aumento di peso (in g) e le proteine consumate (in g);
- **Valore di lisina disponibile (ALV):** è la quota di lisina presente nell'alimento effettivamente utilizzabile ai fini nutrizionali che, sommata a quella non disponibile, dà il valore totale.

La qualità proteica (NPU) della dieta mediamente consumata dalla popolazione italiana è di 0,79, derivante da un indice chimico pari a 0,89 e una digeribilità pari anch'essa a 0,89. A scopo migliorativo si possono produrre vegetali arricchiti nell'amminoacido limitante, come riso arricchito in lisina o soia in metionina. Questo si può realizzare scegliendo cultivar specifiche oppure con modificazioni genetiche. Le supplementazioni e le integrazioni sono particolarmente importanti nella produzione di preparati da impiegare in paesi che hanno scarsità di materiale proteico alimentare. Quando si presenta una carenza o la mancanza degli amminoacidi essenziali nelle proteine della dieta, l'organismo finisce per dare sintomi di insufficienza proteica come disturbi della crescita e del metabolismo proteico e, in generale, il bilancio di azoto diventa negativo. La biosintesi delle proteine in generale è ridotta ed alcuni sistemi di funzionamento cellulare sono impediti poichè vengono a mancare le strutture proteiche vitali. Le proteine introdotte con gli alimenti devono subire, lungo l'apparato digerente, un'idrolisi sempre più spinta da parte di endo ed esopeptidasi che, spezzando via via i legami peptidici, le trasformano in amminoacidi liberi e di-tripeptidi in grado di essere

assorbiti dalla mucosa intestinale. La digestione delle proteine comincia nello stomaco per opera della pepsina che, attaccando le catene dall'interno, le riduce in frammenti facilitando così le successive idrolisi enzimatiche; anche l'acido cloridrico, secreto dalle cellule parietali dello stomaco, svolge un ruolo importante nella digestione delle proteine (in **figura 1.4.4.5** esemplificazione del metabolismo delle proteine:

- In primo luogo, perchè dà l'avvio all'attivazione della pepsina che viene secreta dalle cellule sottoforma di pepsinogeno. L'attivazione, consiste nella rottura di un solo legame peptidico ben localizzato sulla catena e nel conseguente distacco di un peptide; questo processo viene portato avanti, per via autocatalitica, dalle stesse molecole di pepsina che si formano;
- Perchè, abbassando il pH, rende possibile l'azione enzimatica della pepsina;
- Infine, perchè denatura le proteine allo stato nativo di alimenti crudi o poco cotti e, scoprendo i legami peptidici, facilita l'attacco enzimatico.

La fase successiva della digestione avviene nel duodeno per opera di peptidasi pancreatiche, secrete tutte sottoforma di proenzimi: tripsinogeno, chimotripsinogeno, proelastasi, procarbossipeptidasi. L'idrolisi finale dei peptidi in amminoacidi si determina grazie all'opera di amminopeptidasi presenti nei microvilli della membrana degli enterociti. L'assorbimento di intere molecole proteiche è un evento eccezionale nell'adulto, mentre nel neonato si verifica con una certa regolarità, perchè gli anticorpi presenti nel latte materno, giungendo indenni alla mucosa intestinale grazie alla contemporanea presenza di inibitori di peptidasi, vengono così assorbiti. Questo spiega anche i fenomeni allergici a cui vanno incontro i lattanti nutriti con il latte vaccino (Ivo Cozzani- Enrico Dainese, Piccin) . Il metabolismo azotato e gli indici nutrizionali proteici di alcuni alimenti sono visibili nelle **figure 1.4.3, 2.4.3, 3.4.3** .

Figura 1.1.4.3 Contenuto di alcuni amminoacidi totatli in un fagiolo comune(Cappelli-Vannucchi,Zanichelli).

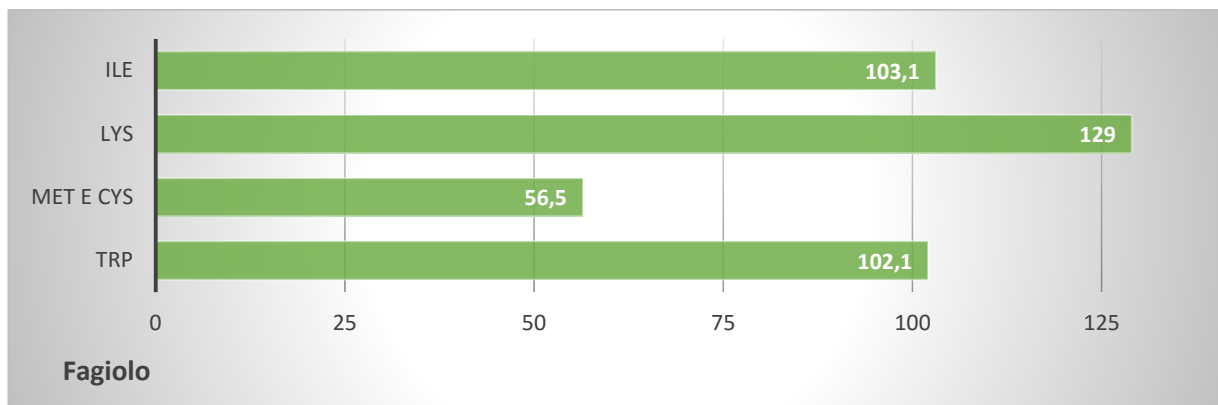


Figura 1.2.4.3 Contenuto di alcuni amminoacidi totali in un frumento comune(Cappelli-Vannucchi,Zanichelli).

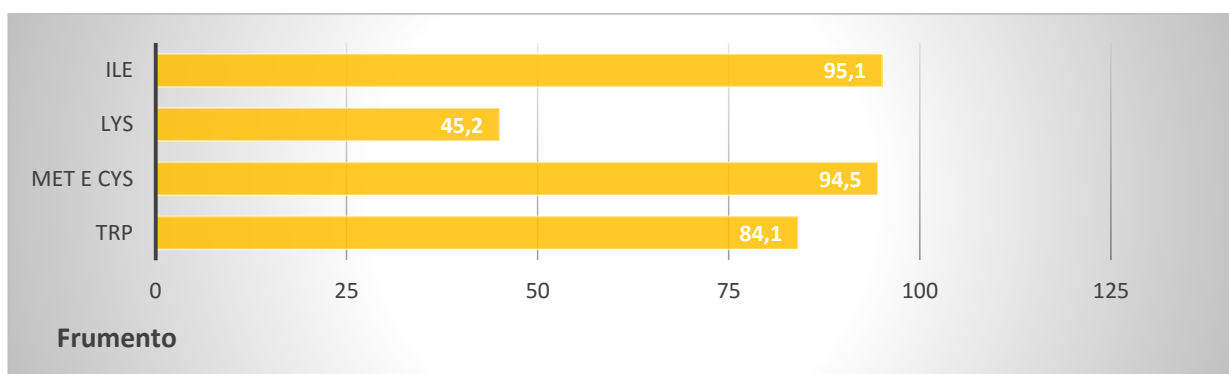


Figura 1.3.4.3 Quantativo amminoacidico totale ottenuto dall'asunzione di fagiolo e frumento con rapporto 1:1 (Cappelli-Vannucchi,Zanichelli)

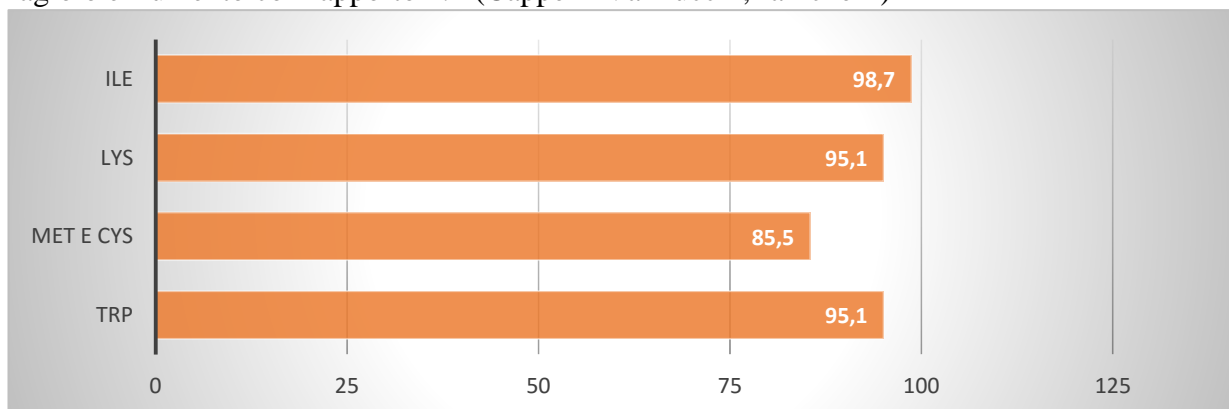


Figura 4.1.4.3 Schema riassuntivo del metabolismo azotato dell'uomo (Ivo Cozzani- Enrico Dainese, Piccin).

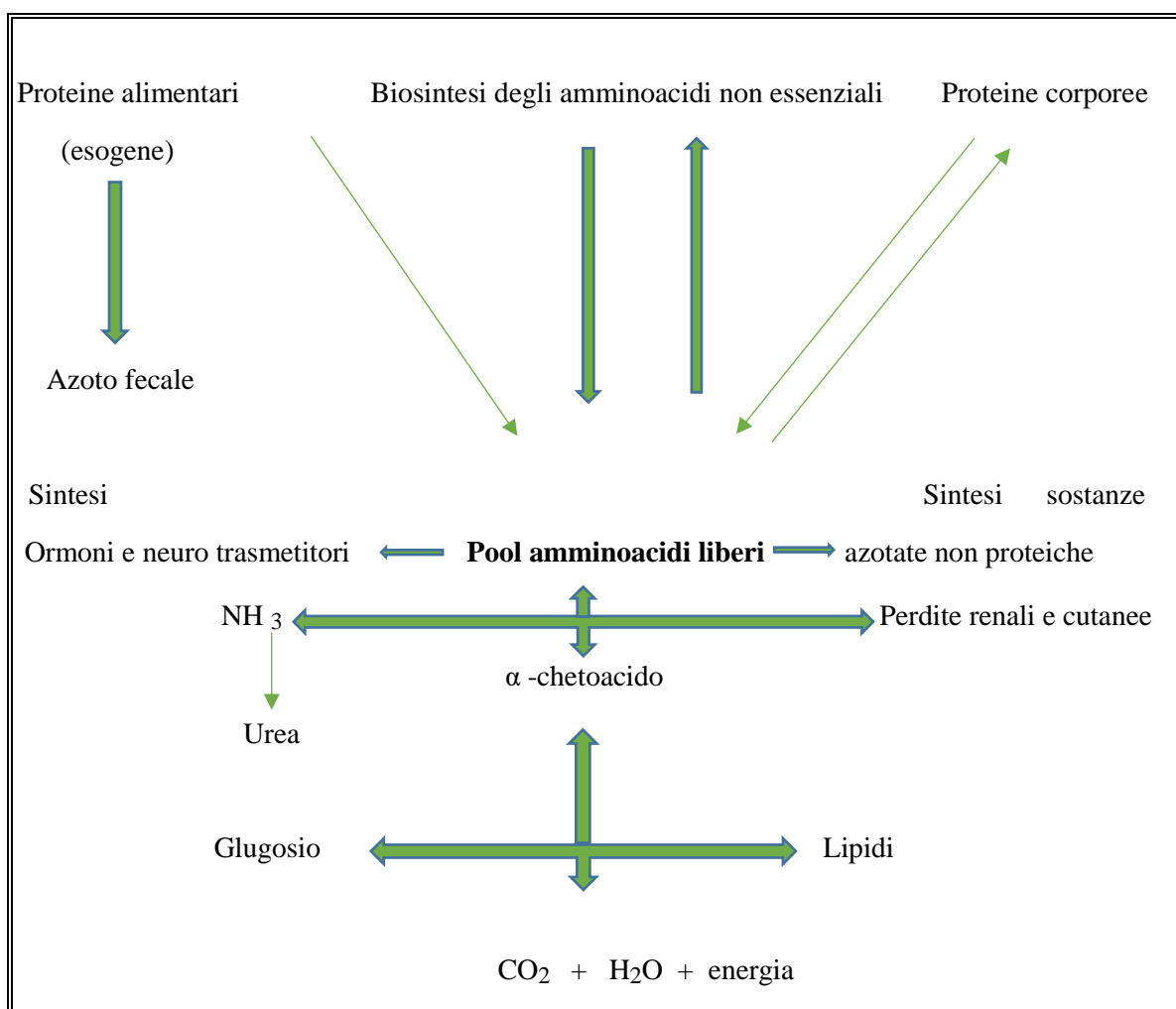


Tabella 1.1.4.3 Indici nutrizionali proteici di alcuni alimenti (Cappelli-Vannucchi, Zanichelli).

	%P	VB	CUD	NPU	PER	INDICE CHIMICO
<i>Latte di mucca</i>	3,5	84	97	82	3,1	94
<i>Uovo</i>	12	94	100	94	3,9	100
<i>Carne di vitello</i>	18	74	90	67	3	100
<i>Pesce</i>	19	80	100	80	3,5	100
<i>Frumento</i>	12	65	61	40	1,5	56
<i>Seme di soia</i>	40	73	83	61	2,3	80

1.4.4 Fabbisogno proteico

Nell'uomo adulto le proteine corporee ammontano a 12 kg circa. E' bene però precisare che non esistono proteine di riserva, ma tutte hanno una peculiare funzione. Giornalmente circa 250 g di proteine sono soggette a turnover, ovvero sono sottoposte ad un continuo processo di demolizione e sintesi. Gli amminoacidi che si liberano con il turnover vengono riutilizzati ma non in modo completo in quanto una parte va persa nel catabolismo ossidativo con formazione di composti azotati, come urea, creatinina, acido urico, che sono escreti con urine, sudore e feci. Altre perdite proteiche derivano dalla desquamazione della pelle, dalla crescita dei capelli, peli e unghie. Vi è dunque una perdita obbligatoria di azoto che deve essere opportunamente reintegrata dalla dieta, pena la negativizzazione del bilancio di azoto. Il corretto fabbisogno proteico deve essere considerato in relazione ad una dieta adeguata dal punto di vista energetico. I valori dei bisogni in proteine sono quindi stabiliti stimando la quantità di protidi di alta qualità (uovo o latte) necessaria per mantenere l'equilibrio dell'azoto in presenza di un apporto di energia, come si è detto, adeguato. I valori calcolati devono però essere opportunamente aumentati nella fase di crescita o età evolutiva, in gravidanza e allattamento. Un consumo di proteine non eccessivamente superiore alle raccomandazioni non è da considerarsi a rischio perchè i sistemi di eliminazione del surplus proteico sono di solito efficienti. Comunque è bene che gli apporti di proteine non oltrepassino il doppio del livello raccomandato. Consumi altamente eccessivi di proteine per periodi prolungati sono invece da sconsigliare per le conseguenze negative che possono derivare, tra le quali l'aggravamento di stati patologici cronici. L'eccesso proteico, in particolare è da evitare nel lattante alimentato con latti formulati in quanto il contenuto proteico del latte materno è circa 1/3 di quello del latte vaccino con il quale si preparano di solito le formule per i lattanti. In alcuni soggetti si possono manifestare casi di intolleranza verso le sieroproteine del latte vaccino (lattoalbumina e lattoglobulina) che, come conseguenza, determinano la messa al bando del latte vaccino e degli usuali latti formulati per l'infanzia. Esistono in

commercio formule per lattanti ipoallergeniche nelle quali l'idrolisi spinta della componente sieroproteica annulla o riduce notevolmente l'intolleranza (Cappelli-Vannucchi, zanichelli). L'intolleranza alle proteine di alcuni cereali (frumento, segale, orzo, avena), vale a dire glutine, si verifica nella malattia celiaca. In questo caso vanno banditi tutti gli alimenti, che contengono anche in piccolissime quantità, il glutine che si comporta come un allergene alimentare. Esistono anche casi di intolleranza a singoli amminoacidi, noti come amminoacidopatie. Si tratta di malattie congenite del metabolismo causate dalla carenza di particolari enzimi per cui l'alterato metabolismo degli amminoacidi in questione può avere conseguenze gravissime. I casi più noti sono quelli relativi all'intolleranza alla fenilalanina e agli amminoacidi ramificati come (leucina, isoleucina, valina) nota come leucinosi o malattia dello sciroppo d'acero. Il fabbisogno proteico totale è maggiore durante la crescita, aumenta in gravidanza e allattamento, nel corso e in seguito a stati patologici (malattie infettive, parassitosi, ferite e bruciature estese ecc.) quando, oltre al ricambio, è necessario anche garantire la formazione di nuove cellule. In questi casi, infatti, aumenta la velocità di sintesi delle proteine e il turnover proteico accelera. Per l'adulto sano, maschio o femmina, la FAO e l'OMS hanno stabilito un *apporto proteico di sicurezza* pari a 0,75 g/Kg peso corporeo al giorno di proteine (52,5 g per l'uomo di riferimento con peso di 70 kg). Dal momento che, in realtà nei paesi occidentali questi valori vengono normalmente raddoppiati e che individui in buono stato di salute introducono il 12-13% di calorie sottoforma di proteine, molte Nazioni, tra cui l'Italia, hanno raccomandato un apporto, più vicino alle proprie abitudini alimentari, di 1 g/kg peso corporeo/die (10% delle calorie totali). Le proteine in eccesso rispetto al fabbisogno non possono venire immagazzinate. Gli amminoacidi quindi subiscono un catabolismo ossidativo o vengono trasformati in glucosio. Infatti, se la quantità di calorie fornite dalla dieta è insufficiente, gli amminoacidi vengono utilizzati in tutto o in parte per produrre energia (Cabras-Martelli, Piccin).

1.5 GLI AMMINOACIDI

Gli amminoacidi sono sostanze bianche, cristalline, di sapore variabile dal dolciastro, all'acido, all'amaro. Sono acidi organici o loro derivati ciclici o aciclici in cui uno o più atomi di carbonio della catena portano uno o più gruppi amminici. Presentano pertanto caratteristiche acide e basiche e sono dotati di comportamento anfotero, potendo reagire sia con gli acidi (donatori di protoni) che con le basi (accettori di protoni) con formazione di due serie di Sali (sale sodico e cloridrato). Gli amminoacidi isolabili dagli idrolisati proteici sono tutti α -amminoacidi, essendo il gruppo amminico sempre legato all'atomo di carbonio in α rispetto al carbossile. A parte la glicina, che otticamente è inattiva, tutti gli altri amminoacidi presentano un carbonio chirale ed appartengono alla serie L. Questo significa che l'atomo di carbonio chirale ha sempre la stessa configurazione, a prescindere dal senso di rotazione che può essere (+) o (-). Oltre ai venti amminoacidi "canonici" che si ottengono dall'idrolisi delle proteine, se ne conoscono altri due che partecipano alla sintesi proteica: la **selenocisteina** e la **pirrolisina** (Cappelli-Vannucchi, zanichelli). In natura si conoscono anche alcuni D-amminoacidi che fanno parte delle membrane di alcuni batteri ma che, generalmente, non sono presenti nelle proteine degli alimenti, salvo qualche caso in cui si formano in seguito a trattamenti tecnologici particolari. Gli amminoacidi conosciuti sono numerosi, ma abitualmente se ne riscontrano solo poco più di una ventina negli idrolisati delle proteine alimentari. Questi sono detti **amminoacidi ordinari**, mentre quelli che si riscontrano solo saltuariamente sono detti **occasionali**. Amminoacidi **essenziali** sono invece detti quelli non sintetizzabili dal nostro organismo che devono perciò essere assunti con la dieta. Gli amminoacidi essenziali sono nove: **fenilalanina, isoleucina, istidina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano, valina; cisteina e tirosina** sono considerati semiessenziali. Gli altri amminoacidi, non essenziali (alanina, acido aspartico, cistina, acido glutammico, glicina, ossiprolina, prolina, serina), mantengono ovviamente anch'essi l'equilibrio del bilancio dell'azoto e sono utilizzati per varie attività biologiche. Essi però possono prendere origine da una fonte anche molto semplice di azoto. La taurina è un derivato della cisteina. Glicina, prolina, arginina, glutamina, e taurina sono anche detti "**condizionatamente essenziali**" in quanto in alcune condizioni fisiopatologiche

possono essere sintetizzati a velocità sufficiente. L'arginina è considerata un precursore dell'ossido nitrico mentre alcuni amminoacidi lo sono di molecole con importanti funzioni biologiche. Il triptofano, per esempio, è un precursore della vitamina PP (niacina) e della serotonina, gli amminoacidi solforati lo sono per del glutazione; la tirosina della tiroxina e dell'adrenalina (Cabras-Martelli,Zanichelli).

1.5.1 Assorbimento e fabbisogno degli amminoacidi

Gli amminoacidi, assorbiti a livello intestinale, arrivano al fegato attraverso la vena porta. Il fegato è l'organo chiave che regola l'utilizzazione e il metabolismo degli amminoacidi, in particolare:

- l'amminoaccedemia e la conseguente distribuzione di amminoacidi a tutti i tessuti dell'organismo;
- la sintesi di molte proteine plasmatiche nonché di quelle utili alle proprie cellule;
- la sintesi di compost azotati non proteici;
- la sintesi di amminoacidi non essenziali;
- la degradazione degli amminoacidi introdotti in eccesso con la dieta o provenienti dal catabolismo delle proteine endogene e la produzione di urea.

Solo una quota del pool ematico e tissutale degli amminoacidi viene direttamente utilizzata dalle cellule per sintetizzare nuove proteine; il resto subisce varie trasformazioni seguendo vie metaboliche, tra cui principalmente:

- *deaminazione ossidativa*: il gruppo amminico degli amminoacidi viene allontanato e sostituito da un gruppo chetonico (l'ossigeno è fornito dall'acqua). Particolarmente importante è la deaminazione ossidativa dell'acido glutammico ad acido α -chetoglutarico, che è catalizzata dall'enzima glutammico deidrogenasi;
- *transaminazione*: consiste nel trasferimento del gruppo amminico da un

amminoacido a un chetoacido che diventa a sua volta amminoacido. L'amminoacido di partenza si trasforma in chetoacido. Attraverso questa via, il nostro organismo sintetizza alcuni amminoacidi non essenziali (alanina da acido piruvico, acido glutammico da α -chetoglutarico, acido aspartico da acido ossalacetico) oppure elimina il gruppo amminico degli amminoacidi cedendolo all'acido α -chetoglutarico. Questo, trasformato in acido glutammico, può liberare ammoniaca grazie all'intervento della glutammico deidrogenasi e poi rientrare in circolo;

- *decarbossilazione*: il gruppo carbossilico viene allontanato e l'amminoacido si trasforma nella rispettiva ammina. Molte di queste ammine, dette biogene, svolgono importanti funzioni fisiologiche (serotonina, tiramina, GABA, dopamina, β -alanina, etanolammina).

Il fabisogno di amminoacidi (**tabella 1.5.1**) è massimo durante i primi mesi di vita, abbastanza alto durante l'accrescimento, mentre cala nell'adulto (tabella) in maniera molto più sensibile di quanto diminuisca il fabisogno proteico totale: in pratica, il rapporto E/T (E = aa essenziali, T = aa totali) si abbassa con l'età. Ciò dipende dalla notevole capacità dell'organismo adulto a riciclare gli amminoacidi essenziali, capacità che aumenta quando l'introduzione proteica diminuisce (Ivo Cozzani-Enrico Dainese, Piccin).

Tabella 1.5.1. Fabisogni di amminoacidi essenziali nell'adulto: valori in mg/kg/die.

Istidina	8-12
Isoleucina	10
Leucina	14
Lisina	12
Metionina + Cisteina	13
Fenilalanina + Tirosina	14
Treonina	7
Triptofano	3,5
Valina	10
Totale aa essenziali	84

2.SCOPO DELLA TESI

Pur vantando antiche tradizioni in tutto l'ambiente italiano centro-meridionale ed insulare, la coltivazione delle **leguminose da granella** e di **cereali** ha subito una notevole contrazione nell'ultimo quarantennio le cui cause possono essere individuate nelle basse rese unitarie, nella diffusione di ordinamenti colturali estremamente semplificati, nella loro limitata possibilità di meccanizzazione. La necessità di un approfondimento della tecnica colturale è quindi estremamente sentita, soprattutto in agricoltura biologica dove tra i problemi che maggiormente limitano la loro diffusione, sono la gestione della flora spontanea e la raccolta meccanica. La presenza di una filiera biologica regionale per la produzione di granelle di proteaginose e cereali per l'alimentazione umana rappresenterebbe una opportunità in termini di disponibilità di materie prime anche per la mangimistica, in quanto una quota significativa di produzione normalmente risulta di qualità non soddisfacente per il consumo umano, e può essere destinata all'alimentazione animale. Di norma tali **sottoprodotti**, se opportunamente valorizzati in una filiera dedicata, conservano un elevato valore nutrizionale, soprattutto in termini di quantità e qualità del contenuto proteico. La possibilità, inoltre, di poter contare su più colture proteaginose (fagiolo, cece, lenticchia, ecc.) e su più colture cerealicole determina una maggiore facilità nella formulazione di mangimi composti equilibrati per diverse tipologie di specie, in funzione delle diverse caratteristiche nutrizionali delle materie prime. Nei sistemi colturali biologici le leguminose si presentano anche come precessioni colturali ideali per i cereali e come possibilità di integrare la nutrizione azotata, punto critico dei sistemi colturali biologici che non può essere risolto facendo uso esclusivamente dell'apporto di input esterni. A quest'ultimo aspetto è anche strettamente collegata la tendenza da parte di molti agricoltori che utilizzano il sistema biologico a reintrodurre varietà antiche o locali di cereali caratterizzate da una maggiore rusticità e da minori esigenze in termini di input (Luigi Giardini 2012). Lo scopo del lavoro è stato quello di ottenere e valorizzare, di conseguenza, dei prodotti, nutrizionalmente superiori come qualità, destinati all'alimentazione umana e dei sottoprodotti destinati alla mangimistica che possiedono un distinto valore biologico rispetto ad altri mangimi. A questo riguardo sono state caratterizzate in maniera qualitativa e quantitativa, con l'utilizzo di

diverse metodiche analitiche, le proteine, gli amminoacidi e le frazioni proteiche presenti nei “**prodotti primari**” e “**sotto prodotti**” della filiera (di due diverse annate 2012/2013), di varie specie di leguminose e cereali coltivati nella regione Toscana. In particolare si sono verificati e confrontati i valori ottenuti dalla quantificazione dell'intero pool amminoacidico (mediante HPLC), con una attenzione critica su **metionina e lisina**, i due amminoacidi che sono proporzionalmente presenti in quantità differenti nei legumi e nei cereali (motivo per il quale si mira alla loro complementarietà nell'alimentazione)

2. MATERIALI E METODI

2.1. Descrizione

La caratterizzazione dei prodotti e dei sottoprodotti della filiera è avvenuta utilizzando come materiale di partenza i campioni di leguminose e cereali provenienti dalle produzioni raccolte all'interno della filiera BIOLEG, (diamo gambe all'agricoltura biologica, progetto misura 124 PSR 2007-2013 della Regione Toscana dell'annata 2012 e di quella 2013 (tabelle 1.21, 2.2.1). In particolare, per quanto riguarda i prodotti primari, cioè quelli destinati all'alimentazione umana, sono state analizzate le seguenti tipologie di granelle di cereali e di leguminose:

Tabella 1.2.1. Specie di cereali poste ad analisi.

2012	2013
Grano Cappelli	Grano Cappelli
Grano del Faraone	Grano del Faraone
Farro monococco	Farro monococco
Farro dicocco	Miglio

Tabella 2.2.1 Specie di legumi sottoposte ad analisi.

2012	2013
Cece nero	Cece nero
Lenticchia	Lenticchia
Cicerchia	Cicerchia
Fagiolo toscanello	Fagiolo toscanello
Cece fiorentino	Fagiolo zolfino
	Cece piccino

Per l'analisi dei sottoprodotti e dei co-prodotti della filiera destinati alla produzione di mangimi sono stati prelevati i seguenti campioni:

Tabella 3.2.1 Sotto-prodotti destinati all'alimentazione animale.

2012	2013
Spezzatura di farro	Grano del Faraone di seconda scelta
Scarto di farro	Crusca d'orzo
Crusca di farro	Crusca di farro perlato
Lenticchia di seconda scelta	
Cicerchia di seconda scelta	

2.1.1 Campionamento

Sono state campionate complessivamente 15 specie, di cui, 5 specie di cereali, 7 di legumi da granella e 7 sottoprodotti tra legumi e cereali destinati alla filiera mangimistica. I campioni, una volta consegnati in laboratorio divisi nelle opportune confezioni, sono stati sottoposti ad analisi chimico-fisiche e molecolari. Parallelamente al campionamento, per ciascuna annata oggetto di studio sono state raccolte informazioni relative alla coltivazioni ed interventi svolti nel periodo di crescita e maturazione della piante. Tutti i campioni all'arrivo in laboratorio sono stati sottoposti a un trattamento di macinazione grazie all'impiego di un mulinetto elettrico con setaccio di 1 mm, ottenendo così delle farine molto fini ed omogenee adatte sia all'analisi delle frazioni proteiche che dei metaboliti secondari. Le farine così ottenute sono state conservate a -20°C in tubi falcon da 50 mL fino al momento di ogni singola analisi.

2.1.2 Analisi quantitativa: Determinazione dell'azoto totale

La determinazione quantitativa delle proteine è stata svolta utilizzando il metodo Kjeldahl (1833, successivamente modificato da Gunning e da Arnoldanno). Più in dettaglio, la procedura prevede una fase iniziale di mineralizzazione dell'azoto totale presente nel campione, che porta alla formazione di ammoniaca, successivamente distillata e titolata. In relazione al volume di acido cloridrico utilizzato, viene calcolato il contenuto in azoto. Tale valore viene poi moltiplicato per una costante (6,25 per le leguminose; 5,7 per i cereali) che ci consente di ottenere il valore di contenuto proteico espresso come percentuale di proteine su 100g di farina.

Apparecchiature:

- Bilancia analitica;
- Digestore (DK 20 Heating Digester);
- Distillatore automatico (KJELTEC SYSTEM 1002 Distilling unit);

- Strumenti per la titolazione;

Reattivi:

- Acido solforico concentrato 0,5 N;
- Catalizzatore in pastiglie (solfato di potassio, solfato di rame e ossido di selenio);

2.1.3 Estrazione delle frazioni proteiche

Nei campioni di cereali e legumi destinati all'alimentazione umana, oltre al contenuto di proteine grezze è stato quantificato il contenuto delle singole frazioni che costituiscono le proteine di riserva dei semi. La caratterizzazione prevede l'estrazione sequenziale delle diverse frazioni (albumine, solubili in acqua; globuline, solubili in soluzioni saline; prolamine, solubili in soluzioni alcoliche; gluteline, solubili in soluzioni acide/alcaline). La valutazione quali-quantitativa è stata eseguita mediante il metodo utilizzato da (Vasconcelos, Machado maia, Campanello nel 2008) modificato per le analisi attuate. Il metodo prevede l'estrazione sequenziale delle principali proteine di riserva utilizzando in successione (**immagine 1.2.2.3**):

- Acqua per le albumine;
- Soluzione di NaCl 0,5 M per le globuline;
- 2-butanolo 55% per le prolamine;
- Tampone sodio fosfato 0,2 M a pH 8 per le gluteline;

L'estrazione sfrutta la diversa solubilità delle frazioni proteiche nelle varie soluzioni citate.

Le albumine risultano solubili in acqua, le globuline in soluzioni saline poco concentrate, le prolamine in 2-butanolo acquoso, e le gluteline in soluzioni basiche.

1. Estrazione delle Albumine: A 0,5 g di campione vengono aggiunti 5 ml di acqua distillata. La miscela è lasciata per 1 ora in agitazione e successivamente centrifugata a 16000 rpm per 20 minuti a 4°C per recuperare il surnatante contenente le albumine. Il pellet è sottoposto a un secondo trattamento di estrazione identico al primo. I volumi recuperati dalle due estrazione vengono addizionati in un'unica falcon.

2. Estrazione delle Globuline: Il pellet proveniente dal primo ciclo è sottoposto a una seconda estrazione con 5 ml di soluzione di NaCl 0,5 M. La procedura di estrazione è analoga a quella delle albumine. Il surnatante estratto con due passaggi successivi viene riunito in un'unica falcon e rappresenta la frazione delle globuline.

3. Estrazione delle Prolammine: Il pellet ottenuto si miscela con una soluzione di 2-butanolo al 55% per l'estrazione delle prolammine. Anche qui vengono ripetuti gli stessi passaggi precedenti con due estrazioni consecutive.

4. Estrazione delle Gluteline: Per ultimo il pellet rimanente viene miscelato con il tampone sodio fosfato 0,2 M a pH 8 e si procede con lo stesso procedimento estrattivo.

Al termine della procedura di estrazione si ottengono 4 campioni che costituiscono le diverse frazioni proteiche.

Dopo l'estrazione le proteine vengono sottoposte ad un ciclo di dialisi (**immagine 2.2.2.3**) overnight a 4°C e in seguito i volumi recuperati vengono sottoposti a liofilizzazione e successivamente a risospensione in tampone TRIS 62,5 mM a pH 6,8.

Immagine 1.2.2.3. Schema dei vari passaggi eseguiti per le estrazioni delle frazioni.

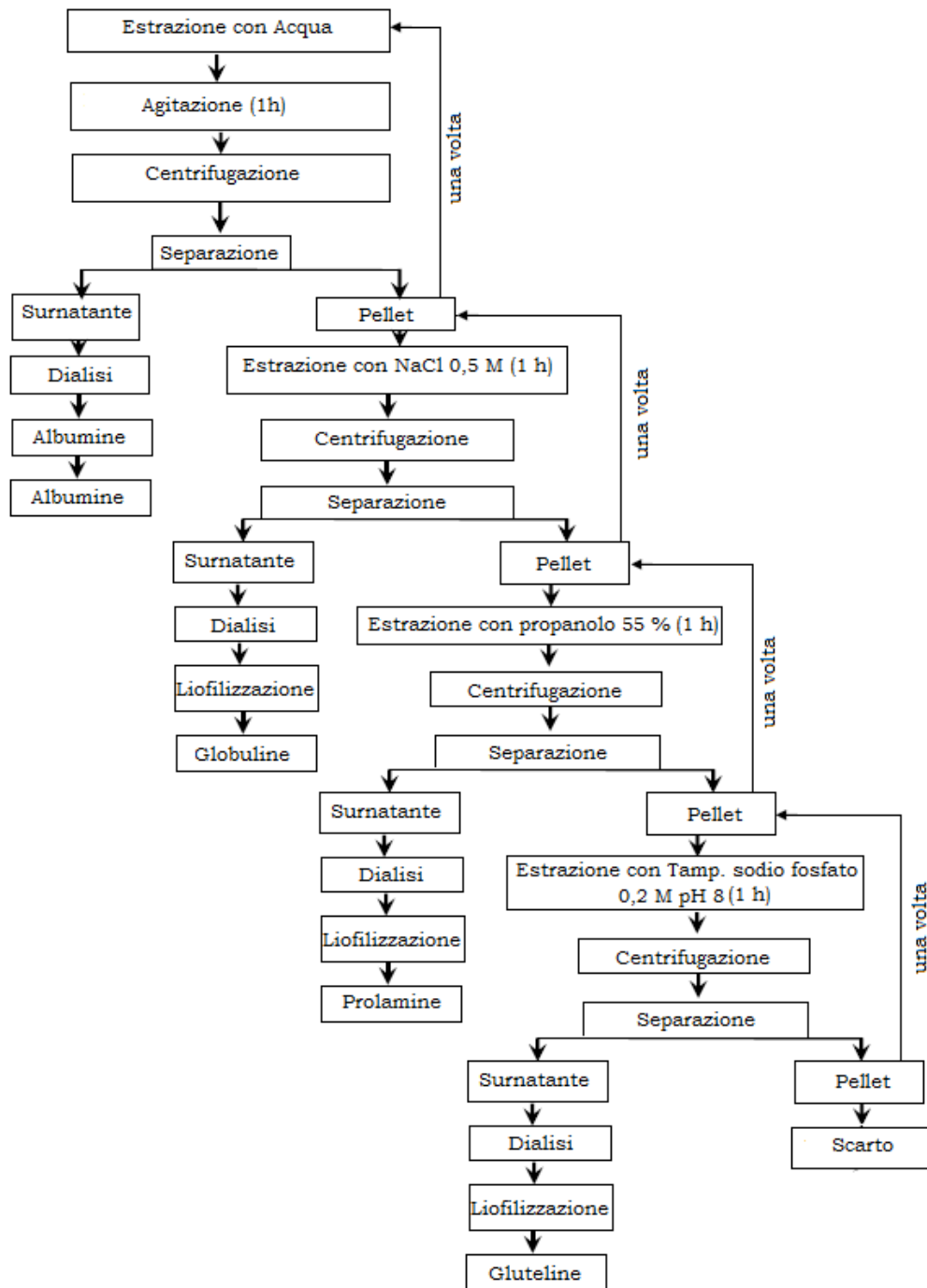
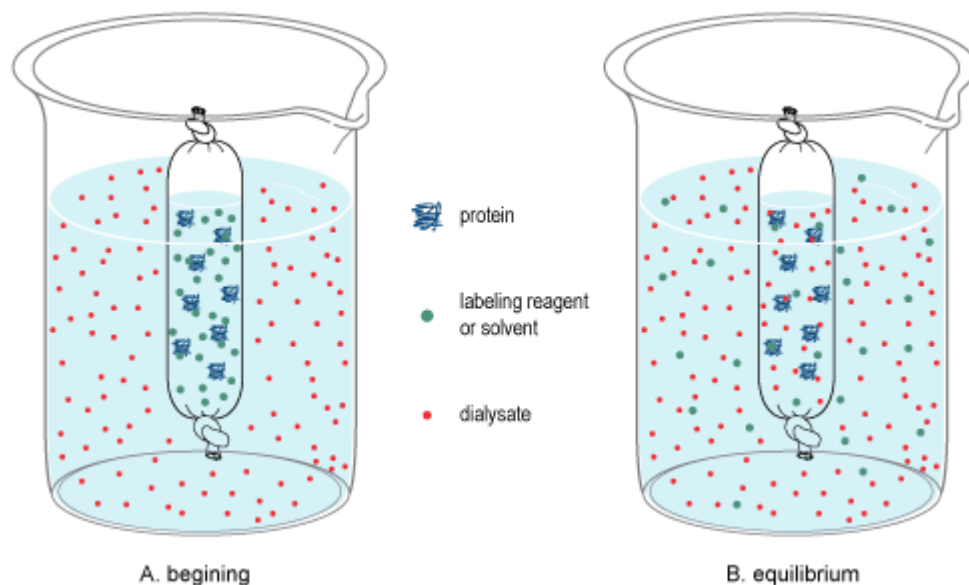


Immagine 2. Esempificazione del processo di dialisi delle frazioni proteiche.



2.1.4 Quantificazione spettrofotometrica

La quantificazione della concentrazione proteica delle diverse frazioni è stata condotta mediante il “*BIO-RAD PROTEIN ASSAY KIT II*“. Per il dosaggio vengono aggiunti in una cuvetta: 790 μ l di acqua Milli-Q, 10 μ l di campione e 200 μ l di reattivo BioRad (volume finale della miscela 1 ml). La miscela viene agitata e incubata a temperatura ambiente per 10 minuti, affinché si realizzi la reazione. In presenza di proteine si ottiene una colorazione azzurra della miscela la cui assorbanza veniva registrata mediante spettrofotometro ad una lunghezza d’onda di 595 nm e paragonata all’assorbanza dello standard di albumina bovina a concentrazione nota. La determinazione della concentrazione proteica dell’estratto, basata sul metodo Bradford (Bradford, 1976), sfrutta l’azione del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250, i cui gruppi sulfonici stabiliscono, in ambiente acido, interazioni elettrostatiche specifiche con i residui amminoacidici basici (specialmente con l’arginina) e aromatici delle proteine. Il legame con le proteine sposta il picco di assorbimento luminoso del colorante da 465 nm a 595 nm, lunghezza d’onda alla quale viene svolta la lettura spettrofotometrica.

Il saggio è rapido, sufficientemente sensibile e risulta lineare a concentrazioni proteiche basse, all'incirca fino a 20-25 µg ml⁻¹. La retta di taratura, all'interno di questo intervallo di linearità, si ottiene utilizzando una soluzione stock 1:1 (1 mg ml⁻¹) di albumina di siero bovino (BSA), da cui vengono prelevate le diverse aliquote per gli standard di calibrazione. Le diverse frazioni sono state aliquotate in eppendorf (10 µg), congelate e liofilizzate, in attesa di essere caricate su gel di poliacrilammide per la corsa elettroforetica.

2.1.5 Analisi del profilo proteico mediante Elettroforesi SDS-PAGE

Questa elettroforesi permette la separazione dei polipeptidi in base al peso molecolare e un'analisi qualitativa della composizione delle diverse frazioni proteiche. Le frazioni estratte dopo la quantificazione sono state aliquotate in modo tale da caricare sul gel 10 µg di proteine. I campioni liofilizzati sono solubilizzati con l'aiuto di un vortex in 20 µl di uno specifico tampone di caricamento composto da Tris-HCl 62.5 mM pH 6,8, glicerolo 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanolo 0,611 M e blu di bromofenolo 0,05%. Le proteine solubilizzate sono infine bollite per 5 minuti prima di essere caricate. Il gel di poliacrilammide è costituito da uno stacking gel al 4% e un running o separating gel al 15% (**Tabella 1.2.1.5**) come riportato nel metodo di Laemmli (1970).

Tabella 1.2.1.5 Composizione dello stacking gel (4 %) e del separating gel (15%)

<i>Reagente</i>	Stacking	Separating
<i>Acqua distillata</i>	12,2 ml	14,0 ml
<i>Acrilamm. /Bis-acrilamm. 30%</i>	2,6 ml	16,0 ml
<i>TrisHCl pH 6,8</i>	5,0 ml	-
<i>TrisHCl pH 8,8</i>	-	10,0 ml
<i>APS 10%</i>	200 µl	400 µl
<i>Temed</i>	20 µl	40 µl
<i>Tot.</i>	~20 ml	~50 ml

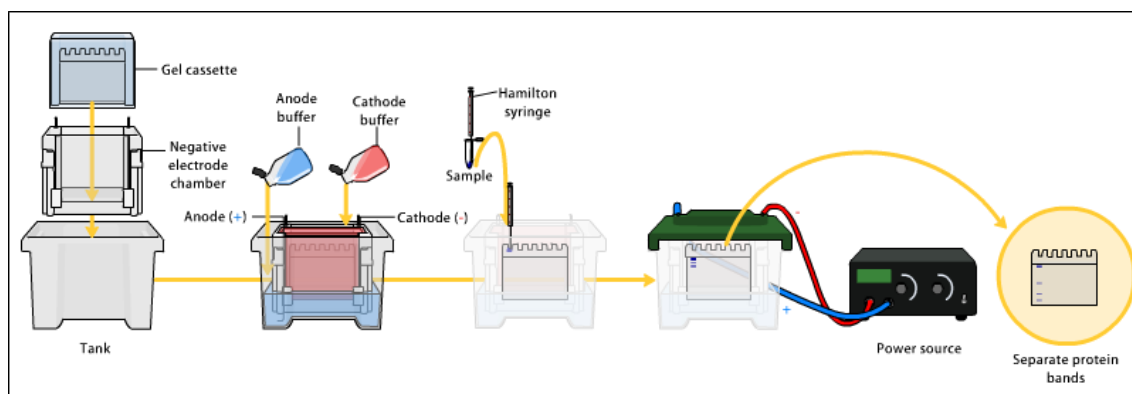
In ogni stacking gel sono creati 10 pozzetti elettroforetici dove venivano caricate le proteine. Il tampone della camera inferiore è composto da Tris-HCl 25 mM e glicina

192 mM. Lo stesso tampone, a cui però è aggiunto SDS 1%, è presente nella camera superiore.

La corsa elettroforetica (esemplificazione nell'**immagine 2.2.1.5**) è stata condotta a 4°C, per circa 2 ore ad un voltaggio costante di 200 mV per gel ed è stata interrotta quando la banda del bromofenolo è arrivata a 0,5 cm dalla fine del gel.

Al termine della corsa il gel è stato lavato velocemente con acqua milliQ e quindi incubato per 40 minuti in agitazione blanda con una soluzione di colorante Blu di Coomassie 0.3% in acido acetico 10% e metanolo 25 %. Il gel è stato quindi decolorato con ripetuti lavaggi in una soluzione di acido acetico 10% e metanolo 25 %, per permettere la visualizzazione delle bande proteiche. Infine i gel sono stati sottoposti a scansione e le immagini acquisite sono state analizzate.

Immagine 2.2.1.5 Schema della fase di preparazione della corsa elettroforetica.



2.1.6 Determinazione degli aminoacidi totali mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)

Per completare la caratterizzazione dei campioni destinati all'alimentazione sia umana che animale, è stato determinato il contenuto degli amminoacidi. In particolare si è posta attenzione al contenuto di lisina, metionina e cisteina per valutare la validità delle diverse tecniche di coltivazione utilizzate che potrebbero aver portato a incrementi nella loro concentrazione. La cromatografia liquida ad alta prestazione è il tipo di cromatografia di eluizione più versatile e largamente usata con lo scopo di separare una miscela nei suoi componenti, per permetterne il riconoscimento qualitativo e quantitativo. Queste tecniche sono basate sulla

distribuzione differenziale dei vari componenti fra due fasi, una chiamata fase fissa o fase stazionaria e l'altra chiamata fase mobile o eluente, che fluisce in continuo attraverso la fase fissa. Le tecniche cromatografiche sono molto utilizzate in diversi campi, essendo particolarmente utili nell'analisi di miscele complesse come quelle costituite dalla maggior parte dei campioni di natura organica (nella **figura 1.2.1.6** è mostrato uno schema di una tipica apparecchiatura per cromatografia HPLC). Pezzo chiave per la separazione delle varie sostanze è la colonna. Le colonne, di impaccatura variabile, sono generalmente costituite da tubi di acciaio inossidabile e possono presentare lunghezze variabili da 10 a 30 cm e diametri interni da 3 a 5 mm. Per quantificare le sostanze è necessario un rivelatore, che possono avere varia natura. Quelli più largamente usati in cromatografia liquida sono basati su misure di assorbanza nella regione dell'ultravioletto o del visibile. Per l'analisi sono stati utilizzati:

- Apparecchiatura (Waters 515 HPLC pump);
- Fornetto riscaldante (per mantenere stabile la temperatura della colonna);
- Colonna per amminoacidi (Waters 5 μ m ODS da 4,6 x 250 mm);
- Rivelatore (Waters 2487 dual λ absorbance detector) lunghezza d'onda stabilita ($\lambda = 254\text{nm}$);
- La separazione è avvenuta utilizzando un gradiente con le seguenti soluzioni:

A: 0.5 ml di trietanolammina (TEA)/L in 0.14 M tampone sodio acetato pH 6.2);
B: aceto nitrile/ H₂O in rapporto 60:40 v/v.

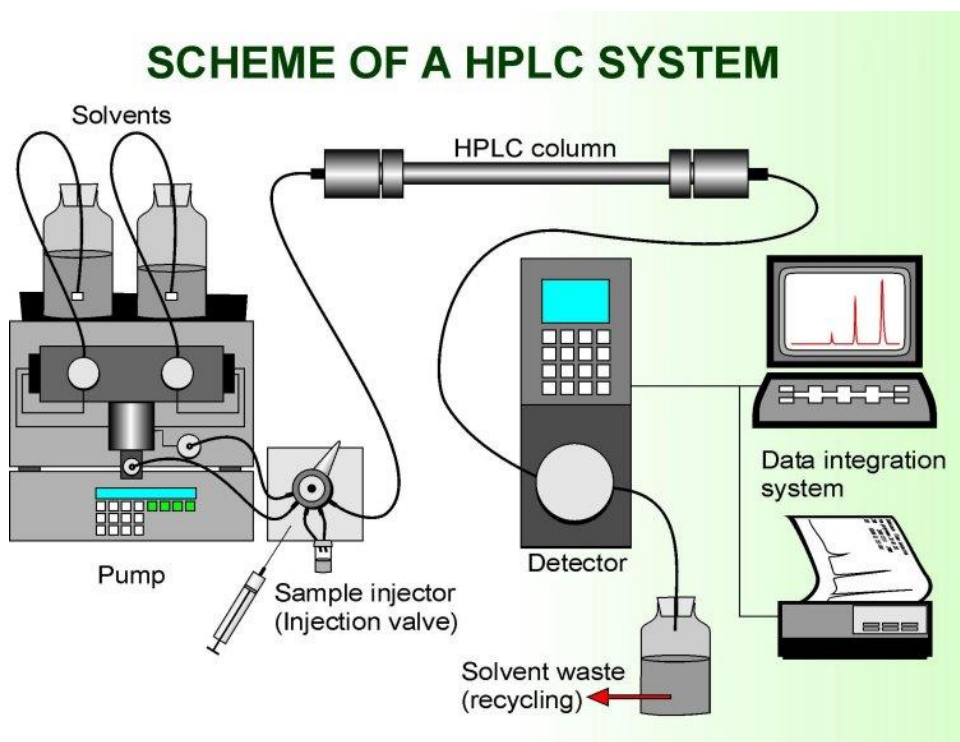
La metodica di analisi utilizzata per il contenuto amminoacidico prevede diversi passaggi di preparazione e purificazione prima che il campione venga iniettato in HPLC:

- Viene effettuata un'idrolisi proteica su 0,05 g di sfarinato con 5 mL di HCl 6N a 110°C per 24h;
- Il campione viene raffreddato e successivamente filtrato con filtri (minisart SRP 15 da 0.45 μ m) e diluito con 3,3 mL di acqua deionizzata;

- Per permettere la lettura in HPLC gli aminoacidi vengono derivatizzati con PITC (fenilisotiocianato), anche conosciuto come reattivo di Edman;
- Sottoposti a 2 cicli di rotavapor addizionando per ogni ciclo 50 μ l di metanolo per purificare il campione.
- Alla fine del ciclo di derivatizzazione il campione viene risospeso in sale fosfato sodico monobasico 5 mM contenente acetonitrile 5% e filtrato una seconda volta prima di iniettato in HPLC.

Lo svolgimento di queste analisi ha richiesto la messa a punto di una metodica specifica per i campioni in esame.

Figura 1.2.1.6. Esempificazione di una classica apparecchiatura per cromatografia HPLC.



3. RISULTATI

3.1.1 Determinazione dell'azoto totale nelle leguminose

Confrontando i contenuti proteici delle granelle considerate, le percentuali ottenute dalle farine di leguminose erano generalmente più elevate di quelle dei cereali. I campioni di leguminose raccolti nel 2012, destinati all'alimentazione umana, hanno mostrato un contenuto percentuale variabile dal 23% del cece nero e del cece fiorentino al 28% della cicerchia (**Figura 1.3.1.1**). Le farine dei campioni di leguminose raccolti nel 2013 hanno mostrato un contenuto percentuale inferiore a quanto osservato per le granelle dell'anno precedente, ed oscillante approssimativamente tra il 17 ed il 24% (**Figura 1.3.1.1**). Come per l'anno 2012, anche nel 2013 il minor contenuto proteico è stato osservato nelle farine del cece nero e il maggiore nella cicerchia, sebbene entrambi i campioni mostrassero livelli proteici inferiori rispetto all'anno precedente.

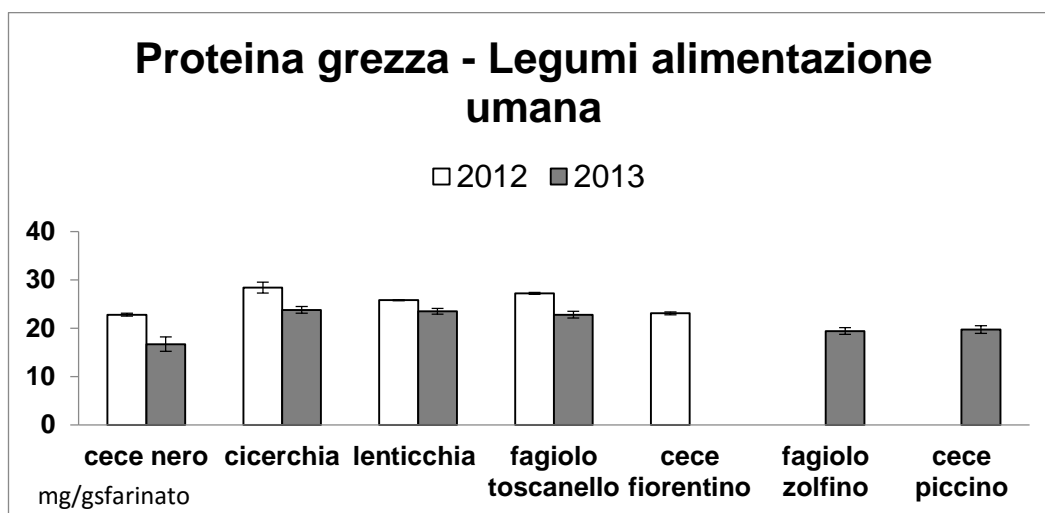


Figura 1.3.1.1: *Contenuto percentuale di proteina grezza in granelle di leguminose destinate all'alimentazione umana. Gli istogrammi riportano i valori medi \pm deviazione standard.*

Negli sfarinati destinati all'alimentazione animale raccolti nel 2012 era ben evidente la differenza nel contenuto di proteine tra cereali e leguminose. Nelle Due

leguminose di 2° scelta testate i valori erano compresi tra il 27 ed il 28 % (**Figura 2.3.1.1**).

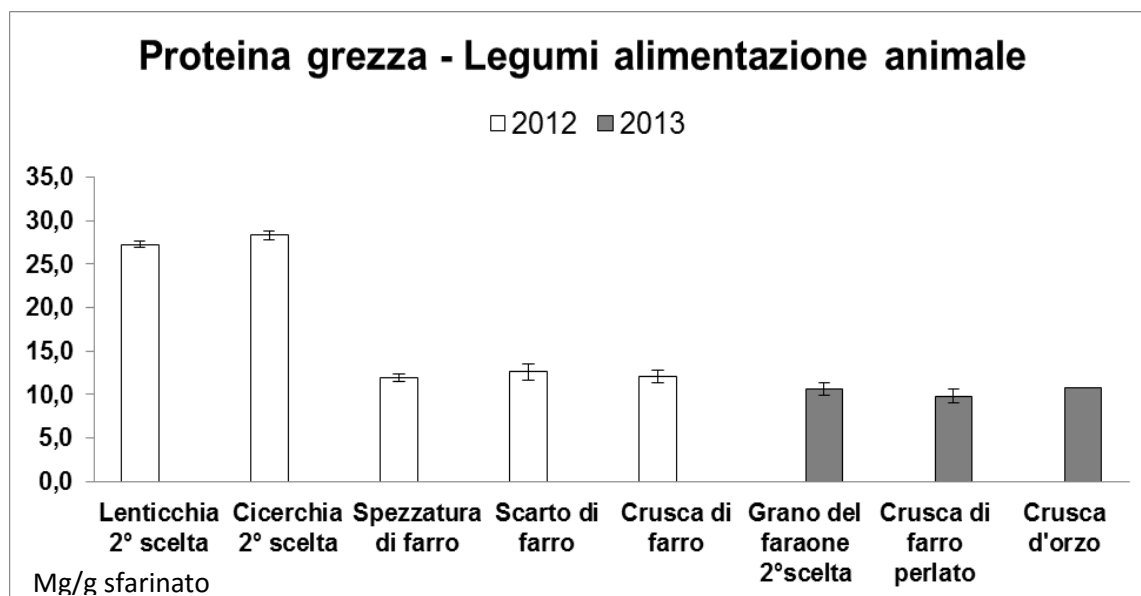


Figura 1.3.1.1: Contenuto di proteina grezza in granelle di leguminose e cereali destinate all'alimentazione animale. Gli istogrammi riportano i valori medi \pm deviazione standard.

3.1.2 Frazioni proteiche dei legumi

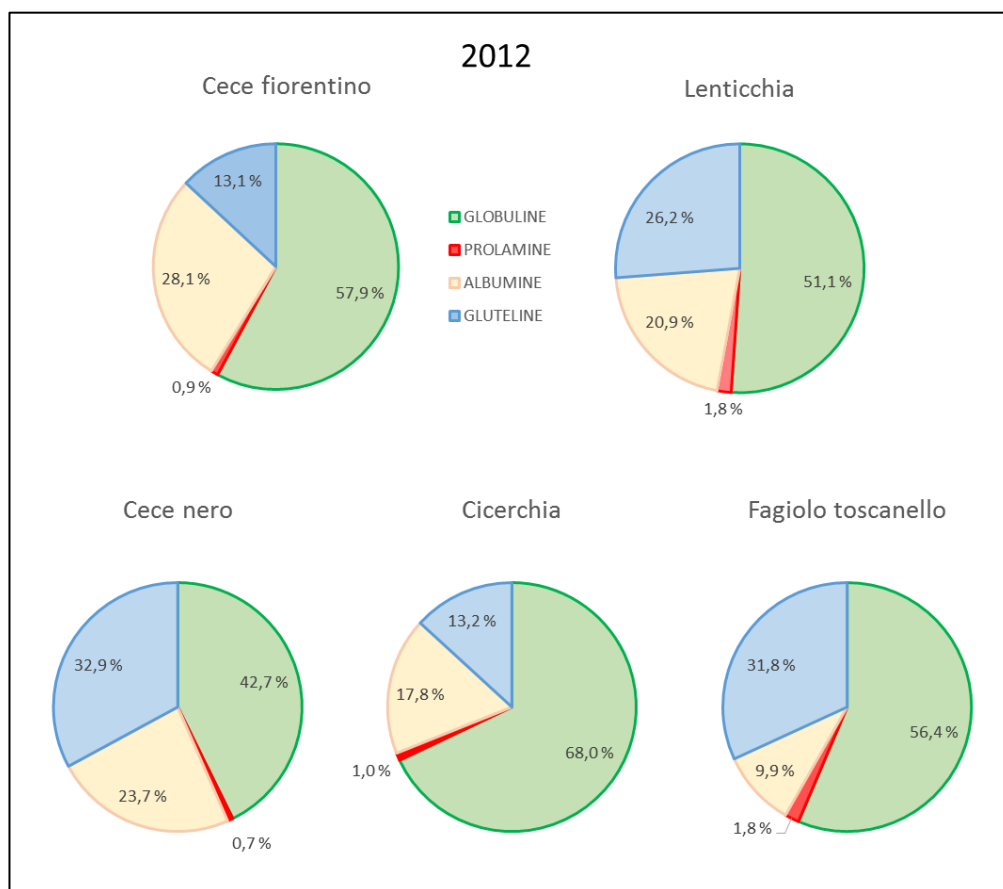
I risultati ottenuti per i legumi mostrano che la frazione più rappresentativa contenuta in questi campioni è quella delle globuline. In particolare, nel 2012 (Tabella 1.3.1.2 e Figura 1.3.1.2), la cicerchia mostrava il più alto contenuto di globuline, con un contenuto di 128,7 mg/g sfarinato, corrispondente al 68% del contenuto proteico totale. Tuttavia, la percentuale di globuline in tutti i campioni di legumi del 2012 non scendeva mai sotto il 50%, con l'eccezione del cece nero in cui questa frazione costituiva il 42,7% (71,8 mg/g sfarinato). Tutti i legumi analizzati mostravano contenuti di prolamine molto bassi rispetto alle altre frazioni in accordo a quanto riportato ad esempio da Tavano et al. (2008) per il cece. I valori analizzati erano compresi tra 1,23 mg/g sfarinato del cece nero e 3,1 mg/g sfarinato della lenticchia a cui corrispondevano percentuali tra 0,7 e 1,8% (campioni 2012). Un prodotto può essere considerato appropriato per il consumo nella dieta dei celiaci se il contenuto di prolamine è in quantità compresa tra il 4 e l'8%

(Mlyneková et al. 2006). Alla luce di questi dati, tutti i legumi del 2012 sarebbero adatti per il consumo da soggetti affetti da malattia celiaca. Riguardo la frazione delle albumine, il fagiolo toscanello mostra il contenuto più basso (11,6 mg/g sfarinato), pari al 9,9%. Gli altri legumi invece contenevano simili percentuali di albumine, comprese tra 17,8 e 28,1%. Il contenuto maggiore di gluteline è stato misurato nel cece nero (55,3 mg/g sfarinato, corrispondente a 32,9%) mentre quello minore nel cece fiorentino (22 mg/g sfarinato, corrispondente a 13,1%).

Tabella: 1.3.1.2 *Contenuto proteico (mg/g di sfarinato) delle diverse frazioni presenti in granelle di legumi destinate all'alimentazione umana. GLB, globuline; PRO, prolamine; ALB, albumine, GLU, gluteline. Sono riportati i valori medi \pm deviazione standard*

	2012				2013			
	GLB	PRO	ALB	GLU	GLB	PRO	ALB	GLU
Cece nero	71.8 \pm 4.3	1.2 \pm 0.1	39.7 \pm 2.0	55.3 \pm 3.2	63.9 \pm 14.2	1.2 \pm 0.1	33.0 \pm 3.0	54.6 \pm 2.2
Cicerchia	128.7 \pm 3.0	1.9 \pm 0.1	33.8 \pm 4.3	25.8 \pm 0.6	107.2 \pm 5.4	2.5 \pm 0.1	24.1 \pm 0.6	14.7 \pm 0.4
Lenticchia	88.9 \pm 4.7	3.1 \pm 0.2	36.3 \pm 2.6	45.5 \pm 0.7	89.0 \pm 3.3	1.5 \pm 0.1	37.9 \pm 4.9	52.2 \pm 4.3
Fagiolo toscanello	65.9 \pm 4.5	2.1 \pm 0.6	11.6 \pm 1.2	37.2 \pm 4.0	80.2 \pm 3.9	1.8 \pm 0.6	12.0 \pm 3.3	14.1 \pm 1.5
Cece fiorentino	96.8 \pm 6.9	1.6 \pm 0.0	46.9 \pm 2.0	21.9 \pm 3.2				
Fagiolo zolfino	-	-	-	-	75.5 \pm 9.0	1.5 \pm 0.6	14.9 \pm 2.3	16.3 \pm 3.9
Cece piccino	-	-	-	-	95.7 \pm 6.1	1.5 \pm 0.8	7.6 \pm 4.4	9.6 \pm 4.1

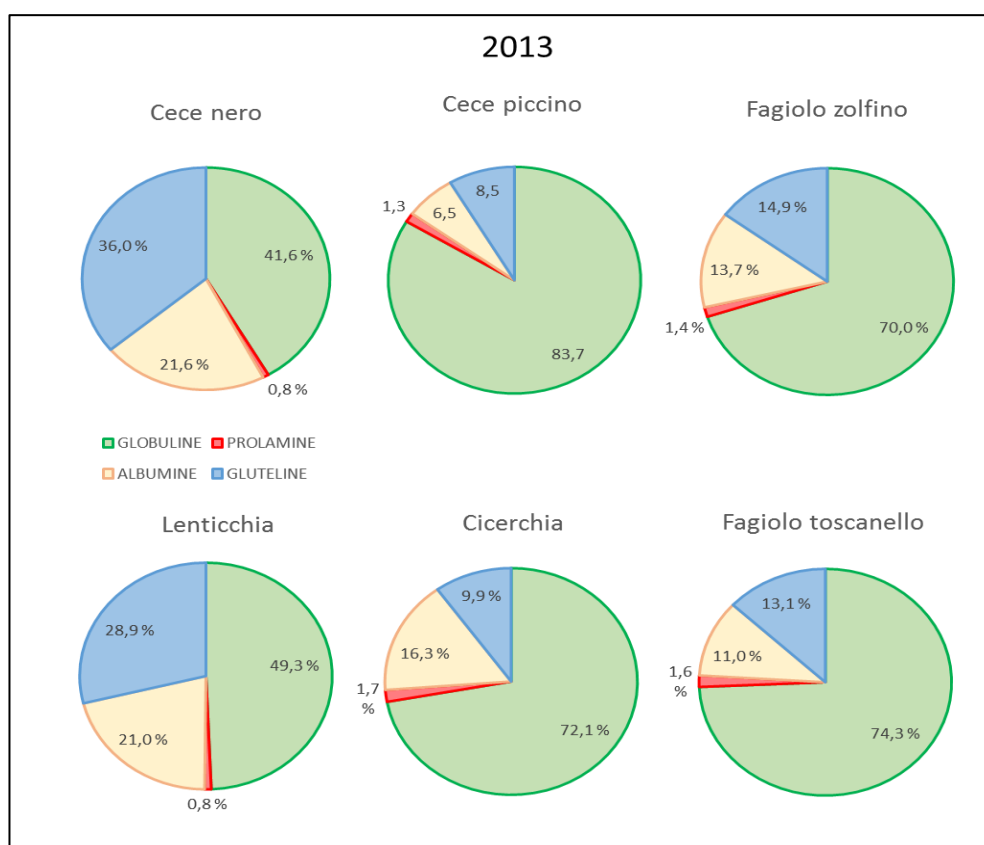
Figura 1.3.1.2: Composizione percentuale delle diverse frazioni proteiche presenti in granelle di legumi destinate all'alimentazione umana, raccolte nel 2012.



I legumi raccolti nel 2013 (**Tabella 2.3.1.2 e Figura 2.3.1.2**) confermano che la frazione più rappresentativa contenuta in questo tipo di granelle è quella delle **globuline**. Di nuovo la cicerchia mostrava il più alto contenuto di globuline, con una concentrazione di 107,2 mg/g sfarinato (-17% rispetto al 2012), corrispondente al 72,1% del contenuto proteico totale. Considerando la composizione percentuale, il cece piccolo con l'83,7% rispetto al contenuto proteico totale, appariva il campione più ricco in globuline. E' interessante sottolineare che il contenuto di globuline del fagiolo toscanello nel 2013 (80,2 mg/g sfarinato) risultava maggiore rispetto al 2012 (+22%), il che determinava anche una diversa composizione delle proteine di riserva rispetto a quella dell'anno precedente. La percentuale di globuline sul contenuto proteico totale nei campioni di cece nero e lenticchia del 2013 scendeva sotto il 50%, costituendo rispettivamente il 41,6% (63,9 mg/g sfarinato) e il 49,3 (89 mg/g sfarinato). Anche i legumi analizzati nel 2013

mostravano contenuti di prolamine molto bassi rispetto alle altre frazioni (**Figura 2.3.1.2**), come già osservato nel 2012. I valori analizzati erano compresi tra 1,2 mg/g sfarinato del cece nero e 2,5 mg/g sfarinato della cicerchia a cui corrispondevano percentuali tra 0,8 e 1,7%. Questi dati confermano che anche tutti i legumi del 2013 sarebbero adatti per il consumo da parte di soggetti affetti da malattia celiaca. Riguardo la frazione delle albumine, il cece piccino mostra il contenuto più basso (7,61 mg/g sfarinato), pari al 6,5%, mentre al contrario la lenticchia aveva il livello più alto (37,9 mg/g sfarinato; +4,5% rispetto al 2012), pari al 21,6% sul totale proteico. La cicerchia nel 2013, in particolare, mostrava invece un contenuto molto inferiore di albumine rispetto al 2012 (-29%).

Figura 2.3.1.2: Composizione percentuale delle diverse frazioni proteiche presenti in granelle di legumi destinate all'alimentazione umana, raccolte nel 2013.



Il contenuto più alto di gluteline nel 2013 apparteneva al cece nero (54,6 mg/g sfarinato, corrispondente a 36%) mentre al contrario il livello più basso apparteneva al fagiolo toscanello (14,1 mg/g sfarinato, corrispondente a 13,1%). Il contenuto di

gluteline nel fagiolo toscanello diminuiva nel 2013 del 62% rispetto al 2012, così come la cicerchia che invece mostrava un calo del 41%. Al contrario, la lenticchia aumentava del 15% il livello di gluteline rispetto all'anno precedente.

3.1.3 Analisi elettroforetica (SDS-PAGE) dei legumi

I pattern elettroforetici delle frazioni proteiche ottenute dai campioni di leguminose raccolti nel 2012 sono mostrate in (**Figura 1.3.1.3**). I profili proteici differivano tra loro in funzione del campione di granella considerato. Le due varietà di cece mostravano per le albumine e le globuline la presenza delle stesse bande proteiche, simili sia a livello qualitativo che quantitativo. Al contrario, molto diverso era il profilo delle gluteline, che nel cece fiorentino mostrava numerose bande tra cui tre molto evidenti tra 45 e 31 kDa. In tutti i legumi, la frazione delle prolammine mostrava la presenza di pochissime bande, con l'unica eccezione del fagiolo toscanello. La cicerchia mostrava 3 bande piuttosto intense per le albumine e numerose bande per globuline e gluteline, che nel complesso erano in accordo al profilo ottenuto da Rosa et al. (2000). Il fagiolo toscanello mostrava un segnale molto intenso per alcune bande della frazione delle globuline e alcune bande ben evidenti nelle albumine e gluteline, con un profilo assimilabile a quello ottenuto da Vasconcelos et al. (2010) per il fagiolo dall'occhio.

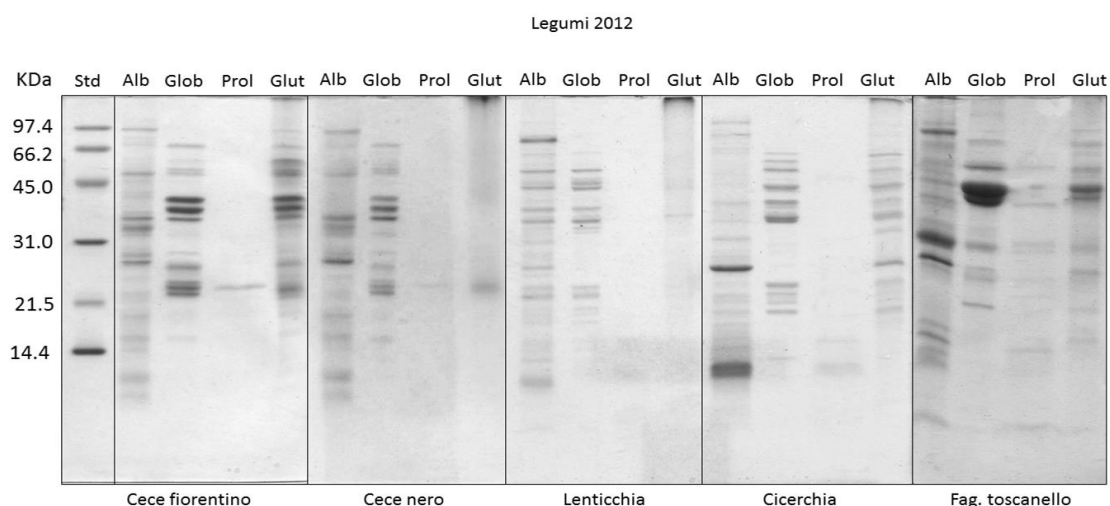


Figura 1.3.1.3: SDS-PAGE delle frazioni proteiche ottenute dai legumi raccolti nel 2012.

I campioni di legumi raccolti nel 2013 (**Figura 2.3.1.3**) e nel 2012 (lenticchia, cicerchia e fagiolo toscanello) mostravano dei pattern essenzialmente simili. Il profilo proteico del fagiolo zolfino, presente solo nel campionamento 2013, risultava molto simile a quello del fagiolo toscanello. Il cece piccino, anch'esso presente solo nella raccolta 2013, mostrava un pattern paragonabile a quello del cece fiorentino del 2012 ma differiva per la sola frazione delle albumine nelle bande comprese tra 66 e 31 kDa. Tuttavia il cece piccino, come del resto il cece fiorentino, risultava estremamente diverso dal cece nero per quanto riguarda il profilo delle gluteline.

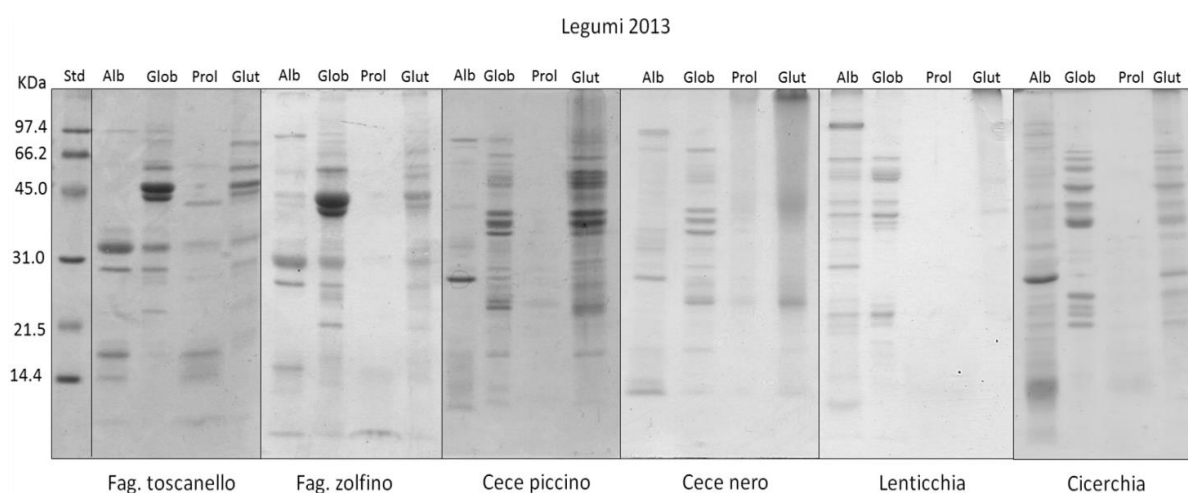


Figura 2.3.1.3: SDS-PAGE delle frazioni proteiche ottenute dai legumi raccolti nel 2013.

3.1.4 Analisi HPLC dei legumi

Il contenuto di lisina in tutti i campioni di legumi 2012 era maggiore di quello della cisteina, che a sua volta era superiore al contenuto di metionina (**Figura 1.3.1.4**). Il minore e maggiore contenuto in lisina è stato misurato rispettivamente nel fagiolo toscanello (19,1 mg/g di sfarinato) e nella cicerchia (27,6 mg/g di sfarinato), mentre un risultato opposto è stato riscontrato per la metionina, che mostrava il contenuto maggiore nel fagiolo toscanello (6,9 mg/g di sfarinato) e il minore nella cicerchia (3,8 mg/g di sfarinato). Il fagiolo toscanello risultava il campione più ricco anche relativamente alla cisteina (16,2 mg/g di sfarinato) mentre il cece nero mostrava i livelli minori di questo amminoacido (12,9 mg/g di sfarinato).

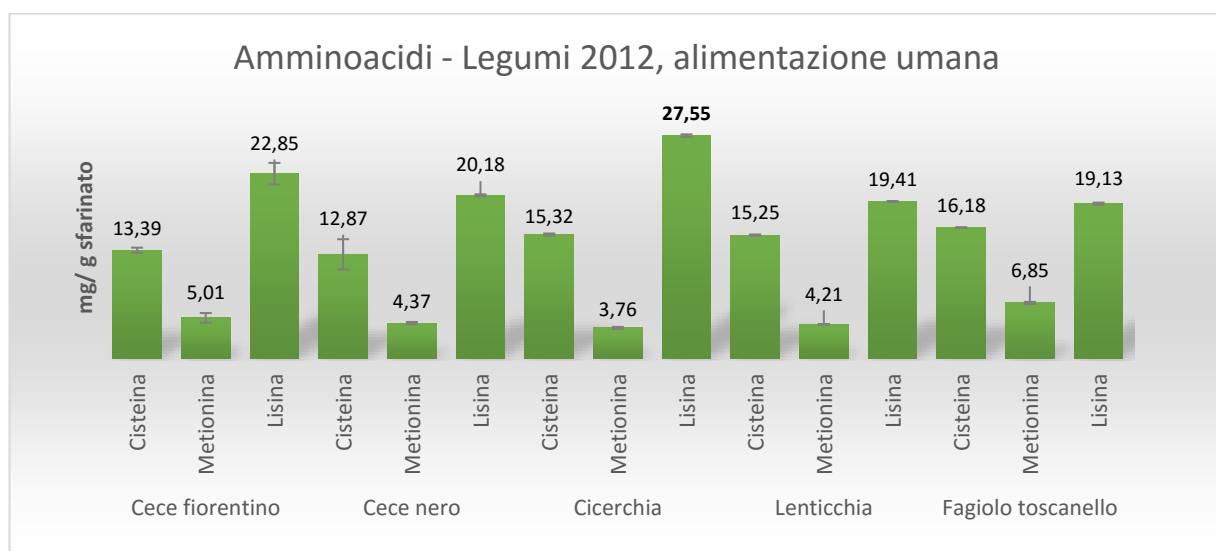


Figura 1.3.1.4: Contenuto degli aminoacidi cisteina, lisina e metionina nelle granelle di legumi destinate all'alimentazione umana, raccolte nel 2012. Gli istogrammi riportano i valori medi \pm deviazione standard

Anche nel 2013, il contenuto medio di lisina in tutti i campioni di legumi era superiore a quello della cisteina, che a sua volta era di nuovo molto superiore rispetto ai contenuti di metionina (**Figura 2.3.1.4**). I legumi raccolti nell'anno 2013 avevano un contenuto medio di lisina compreso tra 20,9 mg/g di sfarinato del cece piccino e 31,4 mg/g di sfarinato del fagiolo toscanello. E' interessante notare un aumento del contenuto di questo amminoacido nel fagiolo toscanello dal 2012 al

2013 (+64%). Il valore più alto per la cisteina è stato riscontrato nella cicerchia (18,3 mg/g di sfarinato; +20% rispetto al 2012) mentre il più basso nella lenticchia (12,3 mg/g di sfarinato; -19% rispetto al 2012). Per la metionina, il cece nero mostrava il contenuto maggiore (6,6 mg/g di sfarinato; +50% rispetto al 2012) mentre la lenticchia, con un valore medio di 2,9 mg/g di sfarinato mostrava il livello minimo (-31% rispetto al 2012).

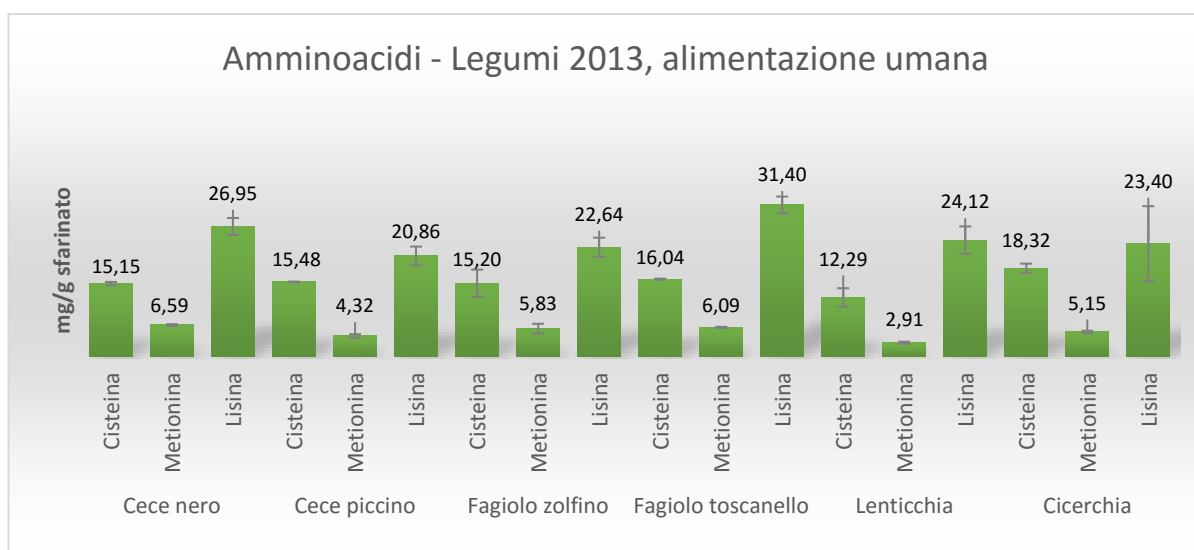


Figura 2.3.1.4: Contenuto degli aminoacidi cisteina, lisina e metionina nelle granelle di legumi destinate all'alimentazione umana, raccolte nel 2013. Gli istogrammi riportano i valori medi \pm deviazione standard.

Oltre alla quantificazione di **lisina** e **metionina** (come detto precedentemente i due amminoacidi che si trovano in quantità differenti nei legumi e cereali e che ne determinano il valore biologico) è stato quantificato anche l'intero pool amminoacidico (**figure 3.3.1.4, 4.3.1.4, 5.3.1.4, 6.3.1.4, 7.3.1.4**), così da permettere una valutazione e un confronto più critico e reale su quelli che possono essere gli incrementi apportati dalla consociazione al metodo di coltivazione. Il cece nero del 2012 presenta un quantitativo discreto di acido glutammico (83,84 mg/g sfarinato), di prolina (54,25 mg/g sfarinato) e di leucina (57,71mg/g sfarinato); anche gli altri amminoacidi mantengono un profilo alto aggirandosi quasi tutti tra gli (11,50 mg/g) e (46 mg/g). Tra quelli presenti in quantità minore troviamo valina (6,6 mg/g) e

triptofano (1,69 mg/g). Nel 2013 troviamo un incremento significativo della glutammina (circa 30,80 mg/g in più) ma abbiamo un dimezzamento netto di tutto il profilo tranne per l'alanina che ha mantenuto un quantitativo di 56,62 mg/g contro i 46,10 mg/g dell'anno precedente.

Figura 3.3.1.4: Quantitativo di amminoacidi totali di cece nero (anno 2012) espresso in mg/g sfarinato.

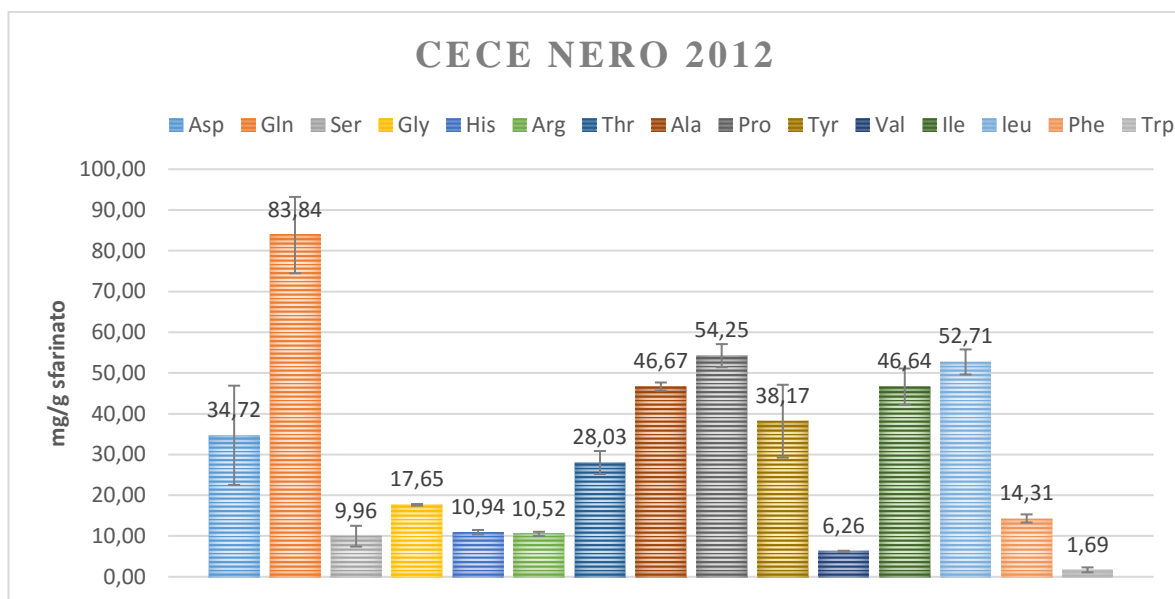
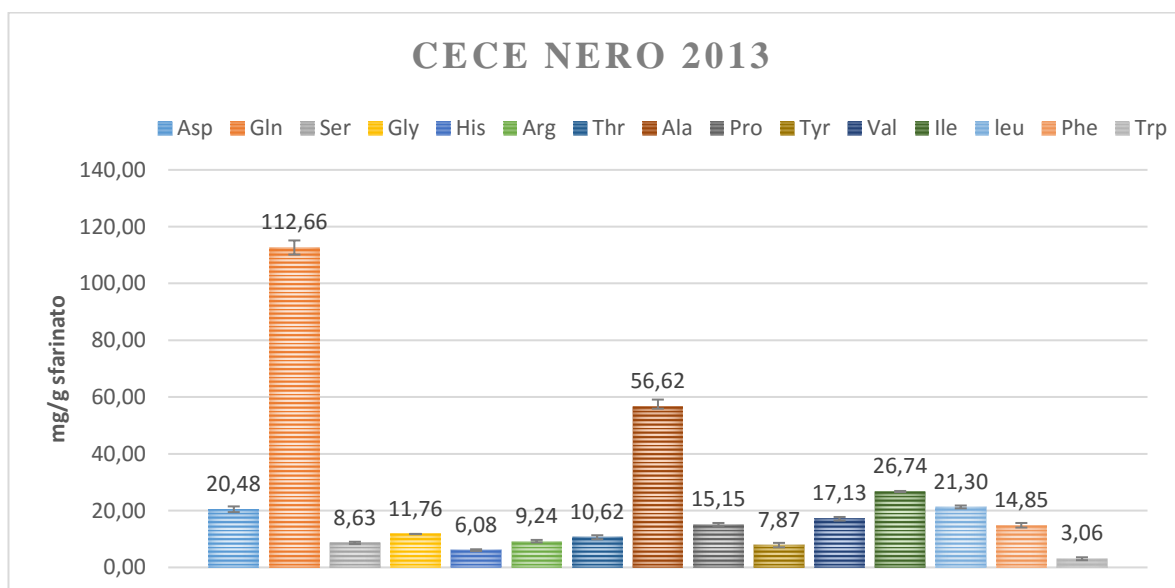


Figura4.3.1.4: Quantitativo di amminoacidi totali di cece nero (anno 2013) espresso mg/g in sfarinato.



Per la lenticchia (**figure 5.3.1.4, 6.3.1.4**) i profili delle due annate sono molto speculari con una differenza di incremento di 8-10 mg/g per ogni singolo amminoacido. Gli amminoacidi presenti in quantità maggiore sono il glutammato (101,73 mg/g), l'acido aspartico (58,52 mg/g), alanina (59,52 mg/g), prolina (49,91 mg/g), isoleucina (55,45 mg/g). Il meno presente è triptofano (3,06 mg/g).

Figura 5.3.1.4: Quantitativo di amminoacidi totali di lenticchia (anno 2012) espresso in mg/g sfarinato.

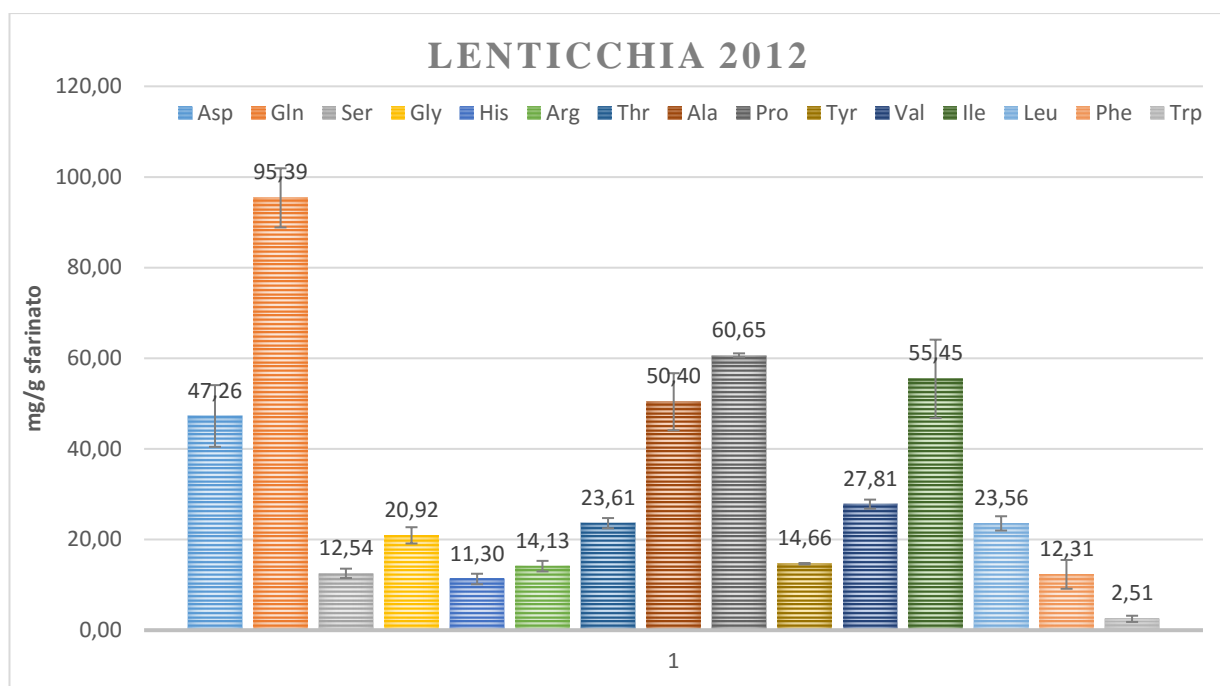
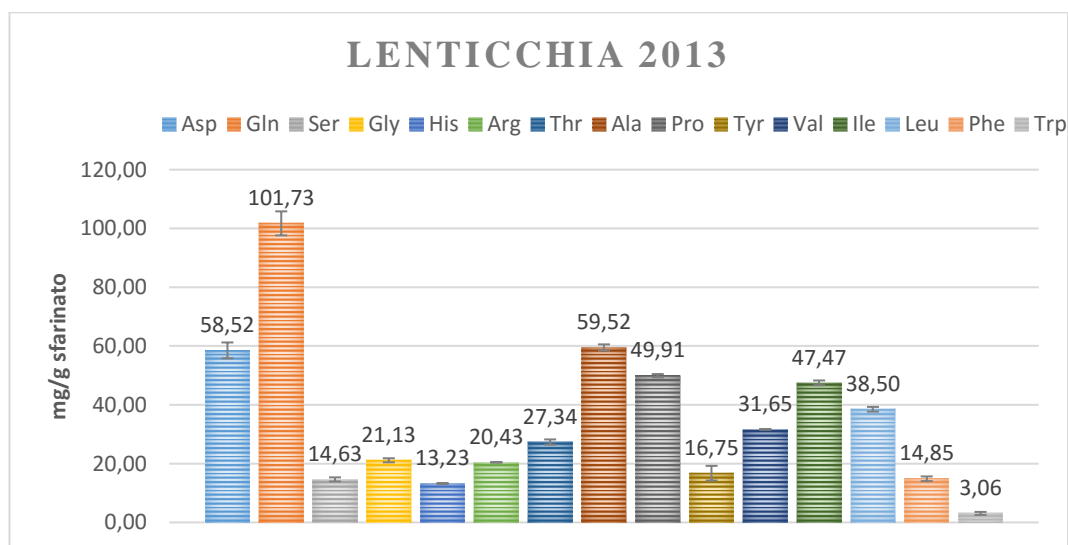


Figura 6.3.1.4: Quantitativo di amminoacidi totali di lenticchia (anno 2013) espresso in mg/g.



Anche per la cicerchia (**Figura 7.3.1.4, 8.3.1.4**) è presente un profilo costante con un buona presenza di tutti gli amminoacidi, tranne il triptofano che da riferimenti bibliografici risulta essere quasi sempre presente con valori bassi nei legumi. I più presenti rimangono l'acido aspartico (61,30 mg/g), il glutammato (117,19 mg/g), l'alanina (117,19 mg/g), la prolina (49,50 mg/g) e valina (30,02 mg/g). Curiosa è una piccola diminuzione nel 2013 dell'acido glutammico che nel 2012 era presente maggiormente; per i restanti amminoacidi non ci sono significativi cambiamenti.

Figura 7.3.1.4: Quantitativo di amminoacidi totali di cicerchia (anno 2012) espresso mg/g sfarinato.

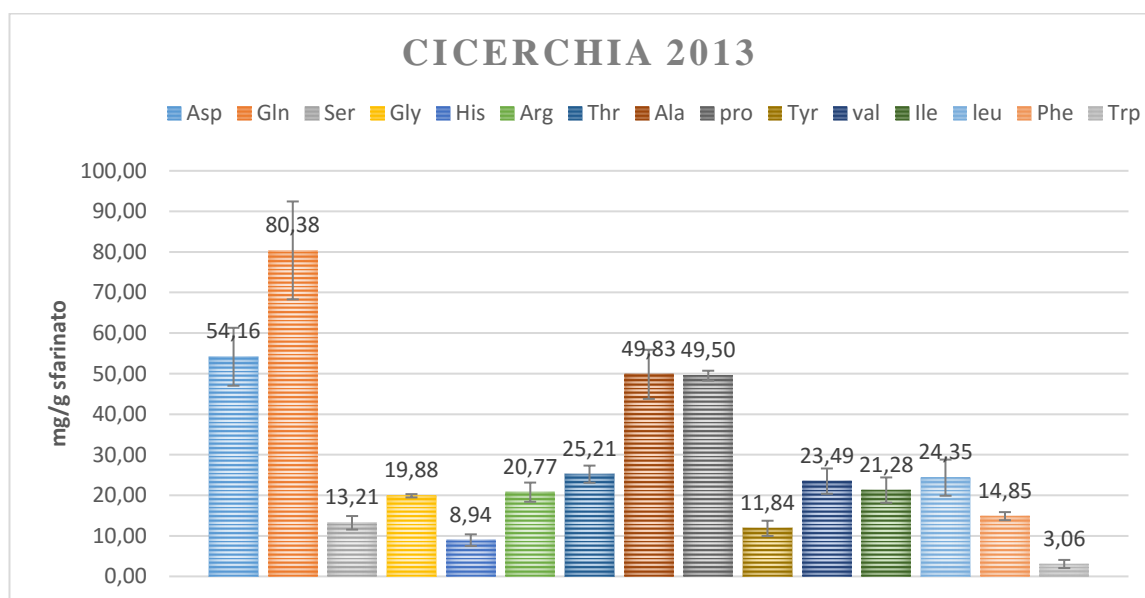
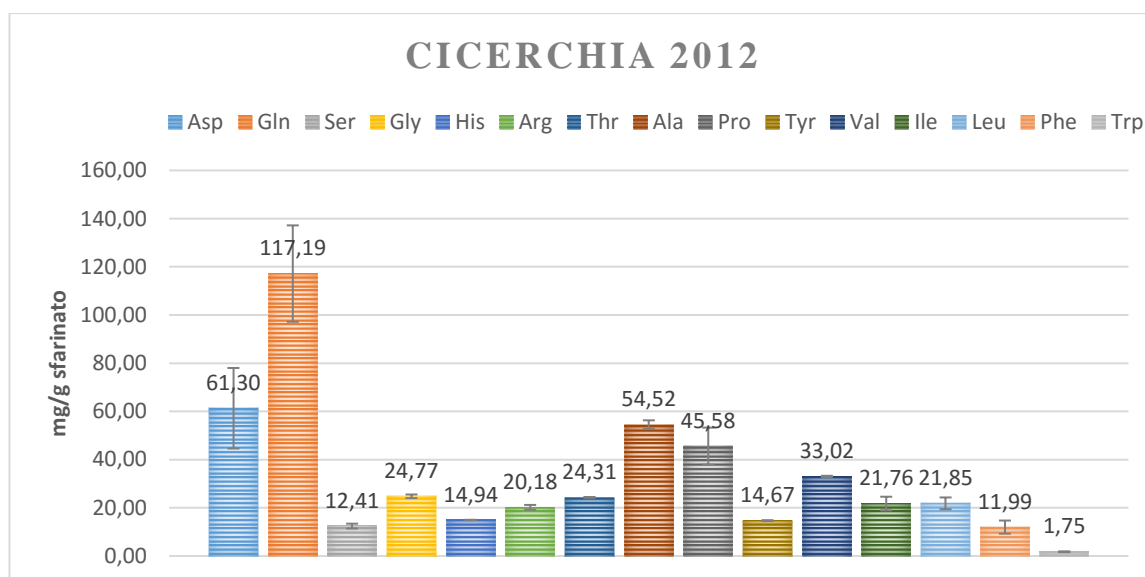


Figura 8.3.1.4: Quantitativo di amminoacidi totali di cicerchia (anno 2013) espresso mg/g sfarinato

Il fagiolo toscanello (**figure 9.3.1.4, 10.3.1.4**) presenta un interessante anomalia tra le due annate. Nel 2013 la quantità di aspartato è di 102,33 mg/g e nel 2012 invece è molto inferiore (42,33 mg/g); analogamente avviene per l'acido glutammico ma in modo inverso: più alto nel 2012 è più basso nel 2013 con una differenza di 82 mg/g. Un altro aspetto da notare è la quantità di triptofano presente nei campioni del 2012 (16,16 mg/g) per poi quasi azzerarsi nel 2013 (0,81 mg/g). Negli altri legumi analizzati la media del triptofano è di 3,40 mg/g. Anche la tirosina subisce un incremento da 12,09mg/g del 2012 per diventare 34,29 mg/g nel 2013.

Figura 9.3.1.4 Quantitativo di amminoacidi totali di fagiolo toscanello (anno 2012) espresso in mg/g sfarinato.

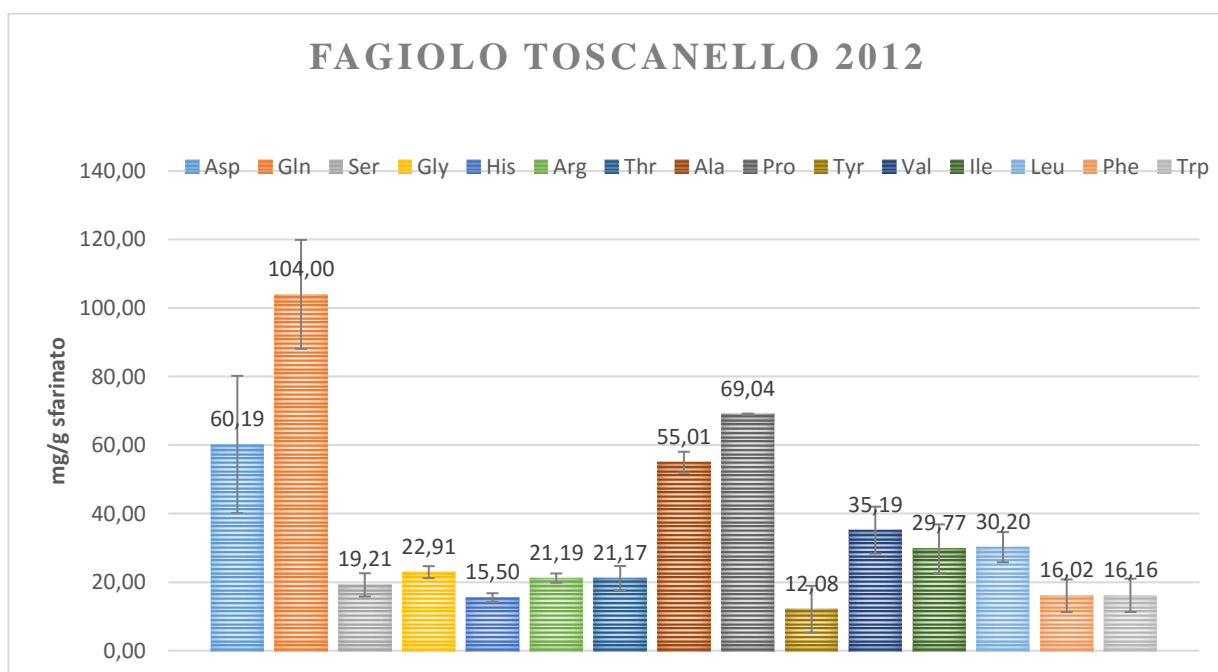


Figura 9.3.1.4 Quantitativo di amminoacidi totali di fagiolo toscanello (anno 2012) espresso in mg/g sfarinato

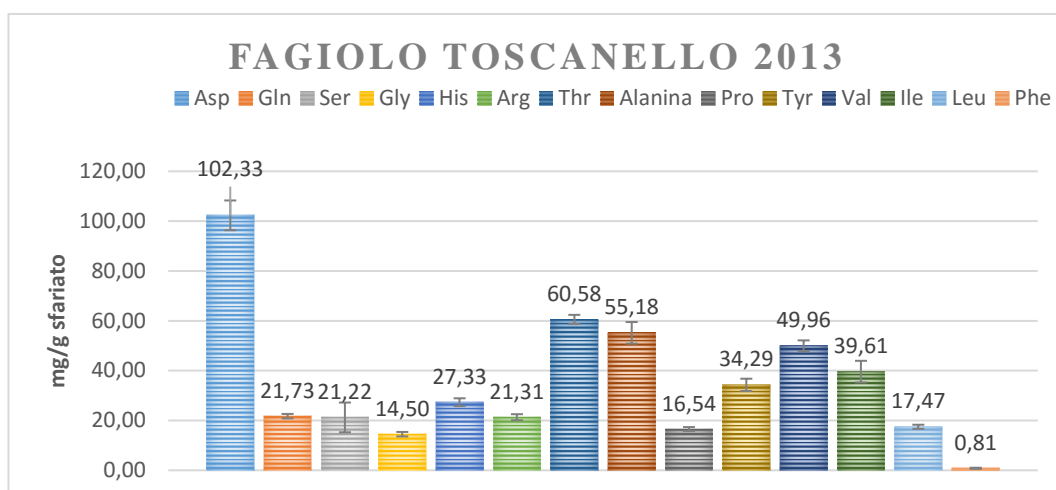


Figura 10.3.1.4 Quantitativo di amminoacidi totali di fagiolo toscanello (anno 2012) espresso in mg/g sfarinato.

Tra i campioni tre varietà sono state analizzate anche tre diverse che non erano presenti in entrambi gli anni di coltivazione, di conseguenza non è stato possibile fare un confronto. Il cece fiorentino (**Figura 11.3.1.4, 12.3.1.4**) presenta un profilo analogo al cece nero, se non per la quantità di isoleucina ritrovata (134,63 mg/g). Il fagiolo zolfino (**Figura 12.3.1.4**) confrontato con il toscanello mostra la presenza di acido aspartico, acido glutammico, in quantità leggermente superiori di 72,54 mg/g e 91,24 mg/g. Un'altra varietà di cece analizzato è quello piccino (**figura 13.3.1.4**), (2013); questo messo a confronto al cece fiorentino non presenta grandi differenze se non un minore quantitativo generale in mg/g su tutto il profilo.

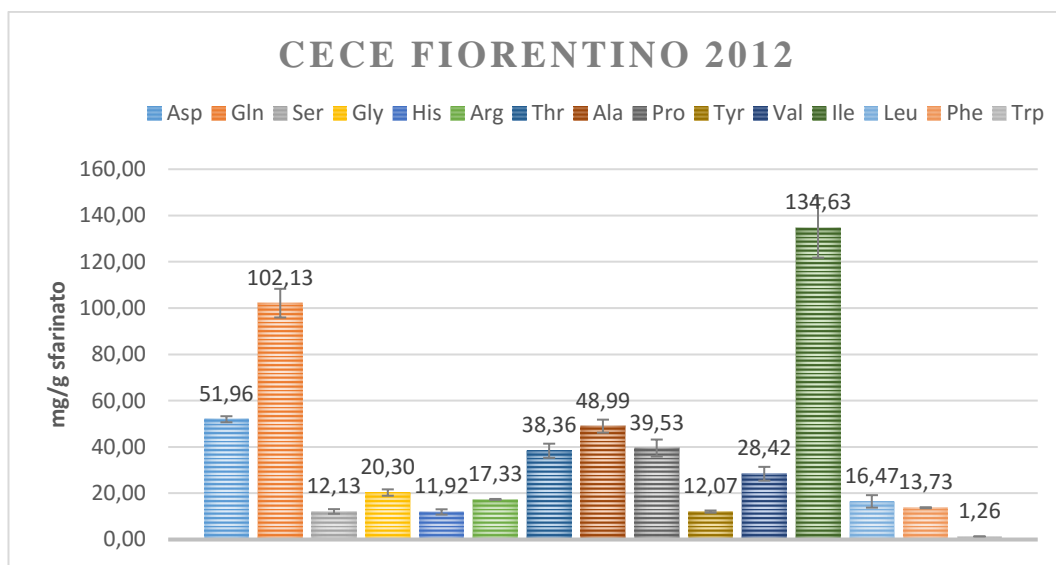
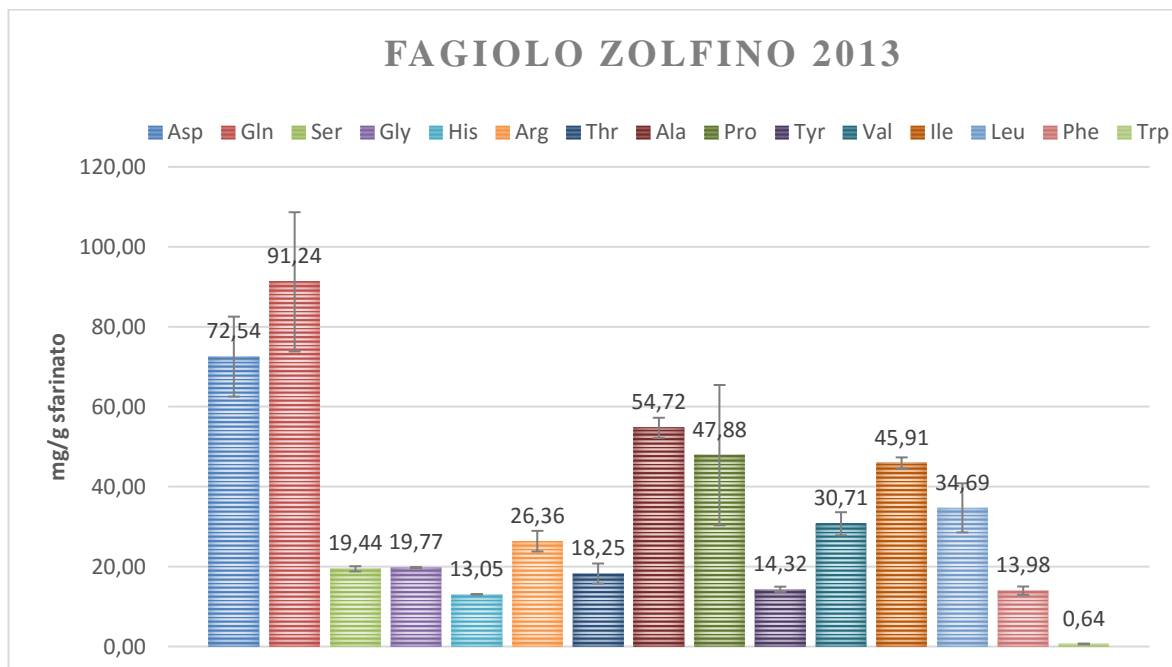


Figura 11.3.1.4 Quantitativo di amminoacidi totali di cece fiorentino (anno 2012) espresso in mg/g sfarinato.

Figura 12.3.1.4 Quantitativo di amminoacidi totali di fagiolo zolfino (anno 2013) espresso in mg/g sfarinato.



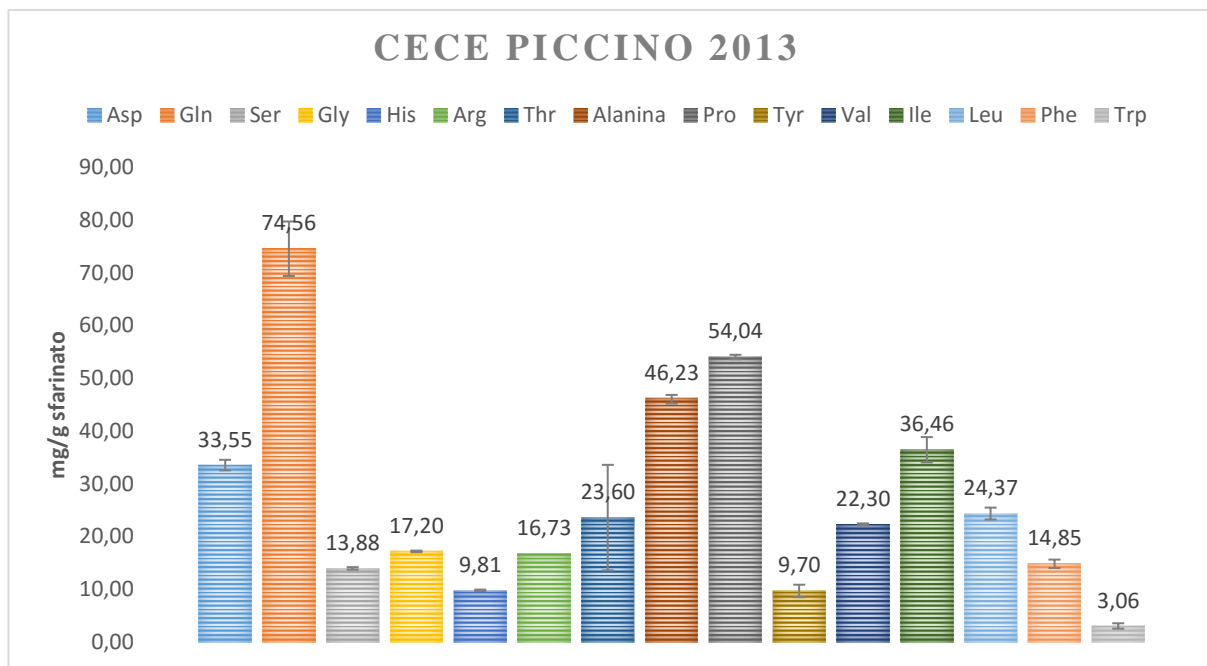
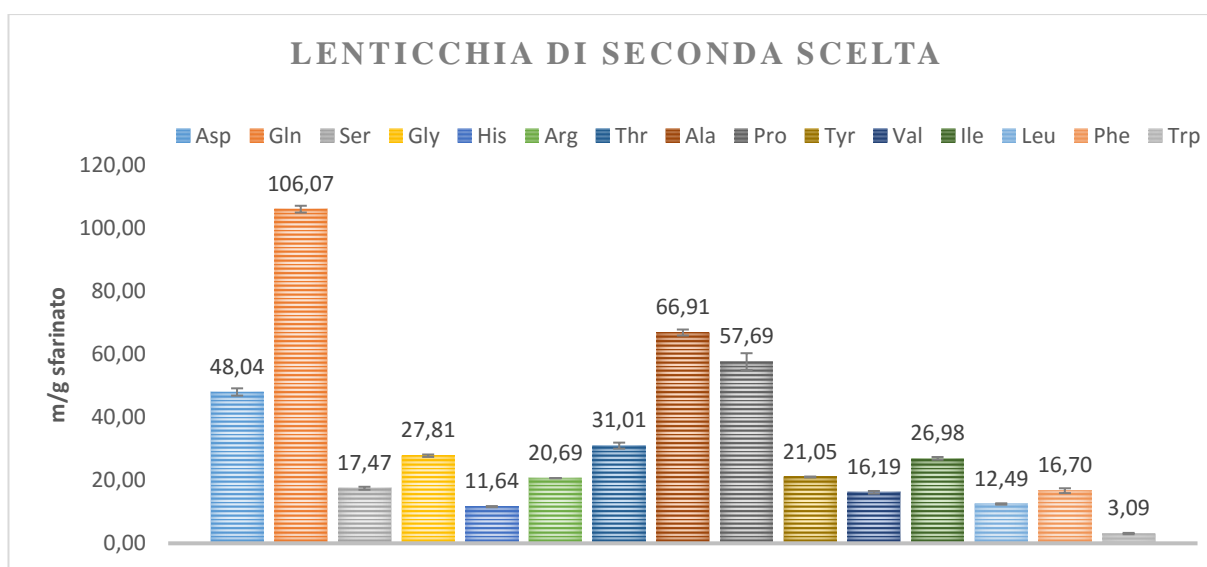


Figura 13.3.1.4 Quantitativo di amminoacidi totali di fagiolo zolfino (anno 2013) espresso in mg/g sfarinato.

Per i sottoprodotti della filiera abbiamo analizzato la lenticchia di seconda scelta. Visualizzando il profilo e mettendolo a confronto con la lenticchia destinata all'alimentazione umana, si nota che stranamente la quantità di amminoacidi è più alta rispetto a quella di prima qualità con un incremento di 6-10 mg/g.

Figura 14.3.1.4 Quantitativo di amminoacidi totali di fagiolo zolfino (anno 2013) espresso in mg/g sfarinato.



3.2.1 Contenuto totale nei cereali

Relativamente alle granelle di cereali, nei campioni raccolti nel 2012 il contenuto di proteine grezze oscillava tra il 9% del grano del faraone ed il 13% del grano Cappelli (Figura 6). Nei campioni di cereali destinati all'alimentazione umana, raccolti nel 2013, sono stati misurati contenuti che oscillavano approssimativamente tra il 10 ed il 14% (Figura 6), leggermente più alti rispetto ai valori osservati nel 2012. All'interno di questo gruppo di campioni i livelli più bassi di proteina grezza sono stati misurati nel miglio (10%), specie non campionata nel 2012, mentre il grano del faraone mostrava la percentuale maggiore, pari al 14%. Rispetto all'anno precedente il grano Cappelli presentava una leggera diminuzione nel contenuto proteico, mentre un aumento del 17 e del 54% è stato osservato rispettivamente nelle farine del farro monococco e del grano del faraone.

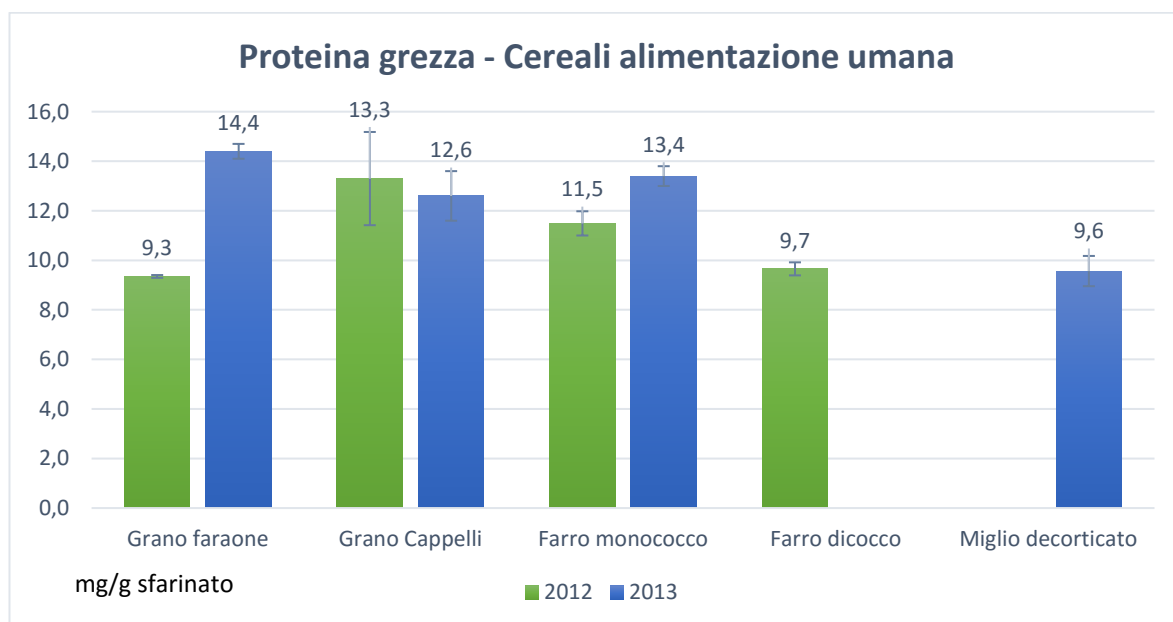


Figura 3. Contenuto percentuale di proteina grezza in granelle di cereali destinate all'alimentazione umana. Gli istogrammi riportano i valori medi \pm deviazione standard.

Negli sfarinati destinati all'alimentazione animale raccolti nel 2012 era ben evidente la differenza nel contenuto di proteine tra cereali e leguminose. La percentuale di proteina grezza contenuta negli sfarinati ottenuti da granelle di cereali oscillava infatti tra il 12 e il 13%, mentre nelle due leguminose di 2° scelta testate, i valori erano compresi tra il 27 ed il 28 % (Figura 4). Gli sfarinati destinati all'alimentazione animale ottenuti dal raccolto 2013 (Figura 4) sono stati tutti ricavati da granelle di cereali. La percentuale media di proteine grezze contenuta in questi campioni oscillava tra il 10 e l'11%. Confrontando i valori del grano del faraone destinato all'alimentazione umana con quello di seconda scelta, si osserva in quest'ultimo un livello di proteine inferiore di circa il 26%.

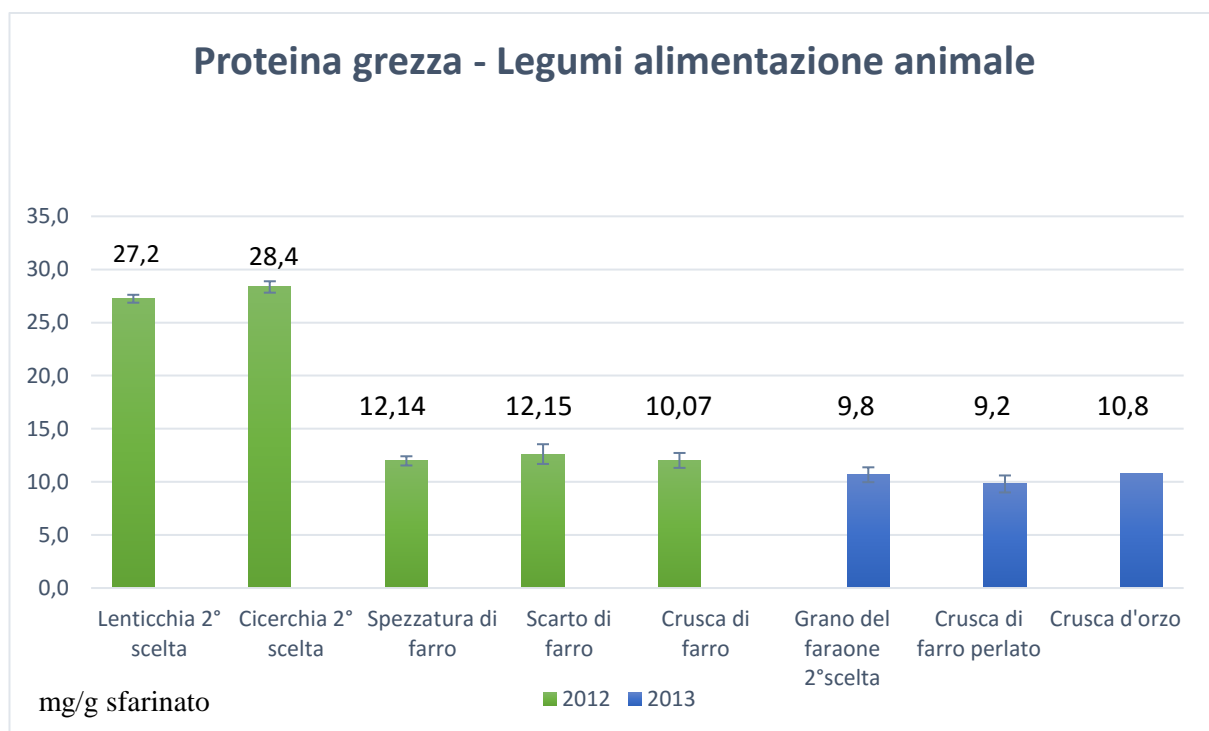


Figura 4: Contenuto percentuale di proteina grezza in granelle di leguminose e cereali destinate all'alimentazione animale. Gli istogrammi riportano i valori medi \pm deviazione standard.

3.2.2 Contenuto delle diverse frazioni proteiche dei cereali

I risultati ottenuti per i cereali raccolti nel 2012 (**Tabella 1.3.2.2 e Figura 1.3.2.2**) non mostrano la presenza di una frazione chiaramente più rappresentativa in nessuno di questi campioni. Nell'annata 2012, solo nel grano Cappelli la somma delle prolammine (gliadine) e gluteline (glutenine) supera il 50% del totale delle proteine di riserva (gliadine + glutenine 54,5%, 16,5 e 16,2 mg/g sfarinato rispettivamente). Il più basso livello di prolammine (gliadine) appartiene al grano del faraone (11,1 mg/g sfarinato), mentre il farro dicocco è il più povero in gluteline (glutenine) con 13 mg/g sfarinato. Rispetto ai valori riportati in letteratura (Merlino et al. 2009) tutte le granelle esaminate sono molto ricche in albumine (24-30%) e globuline (21-25%). Il farro monococco e il grano del faraone risultano rispettivamente il campione più ricco (14,4 mg/g sfarinato) e quello più povero in globuline (10,8 mg/g sfarinato). I contenuti maggiori di albumine sono stati determinati nel farro dicocco e nel grano del faraone (15,4 e 15,5 mg/g sfarinato rispettivamente).

	2012				2013			
	GLB	PRO	ALB	GLU	GLB	PRO	ALB	GLU
Grano faraone	10.8±1.6	11.1±0.0	15.5±0.4	14.2±0.5	14.0±0.7	13.7±2.9	13.2±2.2	13.0±0.7
Grano Cappelli	13.1±1.0	16.5±0.4	14.3±0.3	16.2±1.0	16.1±0.4	14.7±2.1	13.9±0.1	9.0±0.7
Farro monococco	14.4±0.6	13.9±0.2	14.7±0.5	14.4±0.1	13.8±0.2	16.4±0.5	14.8±0.7	16.0±0.4
Farro dicocco	12.8±0.2	12.4±0.6	15.4±0.5	13.0±0.8				
Miglio decorticato					5.7±0.2	3.0±0.4	8.9±0.3	7.9±1.0

Tabella 1.3.2.2: Contenuto proteico (mg/g di sfarinato) delle diverse frazioni presenti in granelle di cereali destinate all'alimentazione umana di due anni di sperimentazione. GLB, globuline; PRO, prolammine; ALB, albumine, GLU, gluteline. Sono riportati i valori medi ± deviazione standard

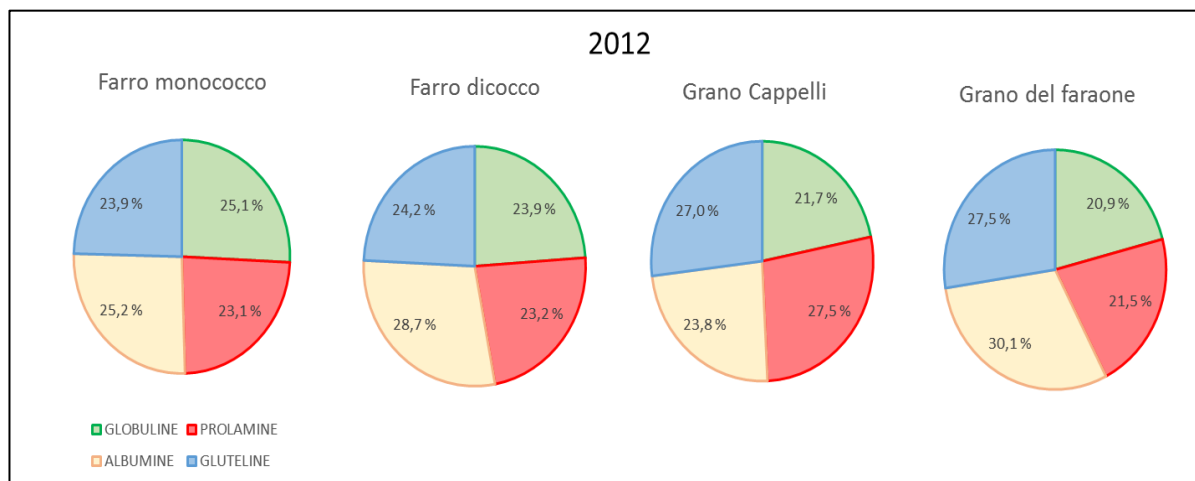


Figura 1.3.2.2: Composizione percentuale delle diverse frazioni proteiche presenti in granelle di cereali destinate all'alimentazione umana, raccolte nel 2012.

I risultati ottenuti per i cereali raccolti nel 2013 (**Figura 2.3.2.2**) confermano una certa differenza rispetto a quanto riportato precedentemente in letteratura relativamente ai contenuti delle diverse frazioni. Nel 2013, prolamine (gliadine) e gluteline (glutenine) sono riconosciute come le principali proteine di riserva nel solo farro monococco (gliadine + glutenine 53,2%, 16,44 e 16,44 mg/g sfarinato rispettivamente), mentre in tutti gli altri campioni di cereali la loro somma percentuale è al di sotto del 50%. Nel 2013, le granelle esaminate mostrano contenuti di albumine che variano tra 8,9 mg/g sfarinato del miglio a 14,8 mg/g sfarinato del farro monococco. Riguardo le globuline invece i livelli ottenuti erano compresi tra 5,7 del miglio e 16,1 mg/g di sfarinato del grano Cappelli.

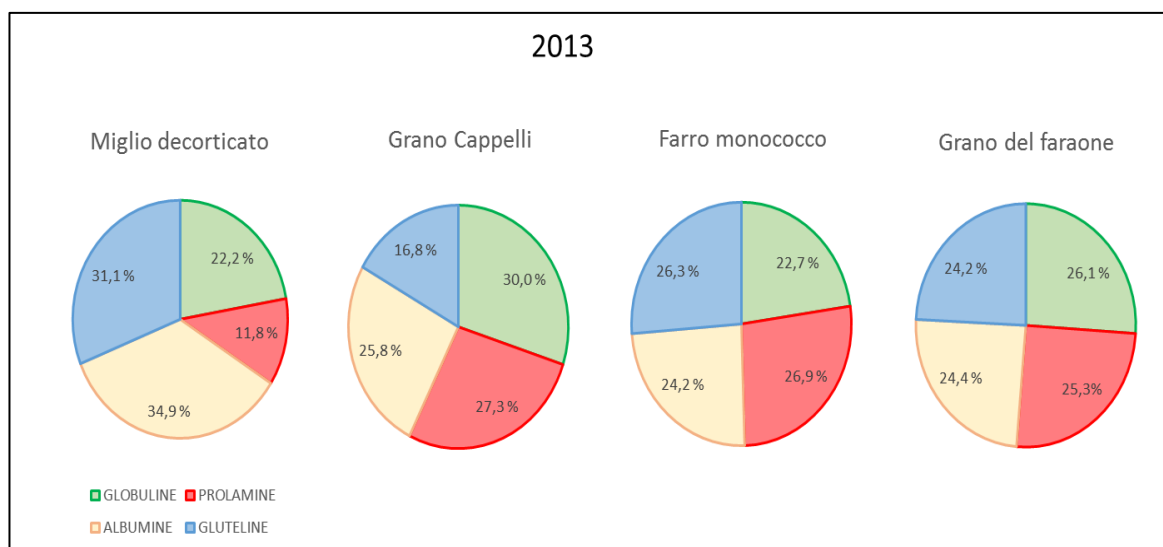


Figura 2.3.2.2: Composizione percentuale delle diverse frazioni proteiche presenti in granelle di cereali destinate all'alimentazione umana, raccolte nel 2013.

3.2.3 Pattern elettroforetico delle proteine dei cereali

Anche i profili proteici ottenuti dai campioni di cereali raccolti nel 2012 differivano tra loro in funzione del tipo di granella considerato (**Figura 1.3.2.3**). In tutti i campioni di cereali albumine e globuline sono caratterizzate da un ricco pattern di proteine lungo tutto il range di pesi molecolari. Le prolamine di farro monococco e dicocco erano presenti soprattutto nella regione compresa tra 45 e 31 kDa. Il solo farro monococco presentava una banda intensa a 14.4 kDa. Il pattern delle gluteline nelle due varietà di farro era abbastanza uniforme seppur con alcune differenze qualitative e quantitative ben evidenti.

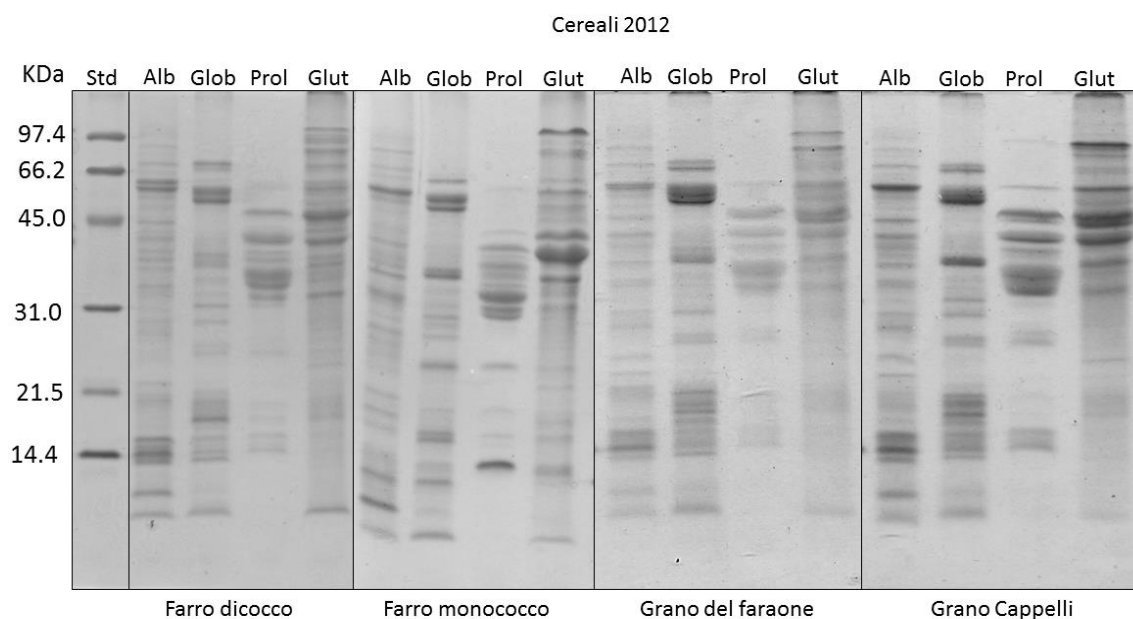


Figura 1.3.2.3: SDS-PAGE delle frazioni proteiche ottenute da cereali raccolti nel 2012

I profili polipeptidici dei cereali campionati nel 2013 (**Figura 2.3.2.3**) erano molto simili sia qualitativamente che quantitativamente a quelli dei campioni raccolti nel 2012.

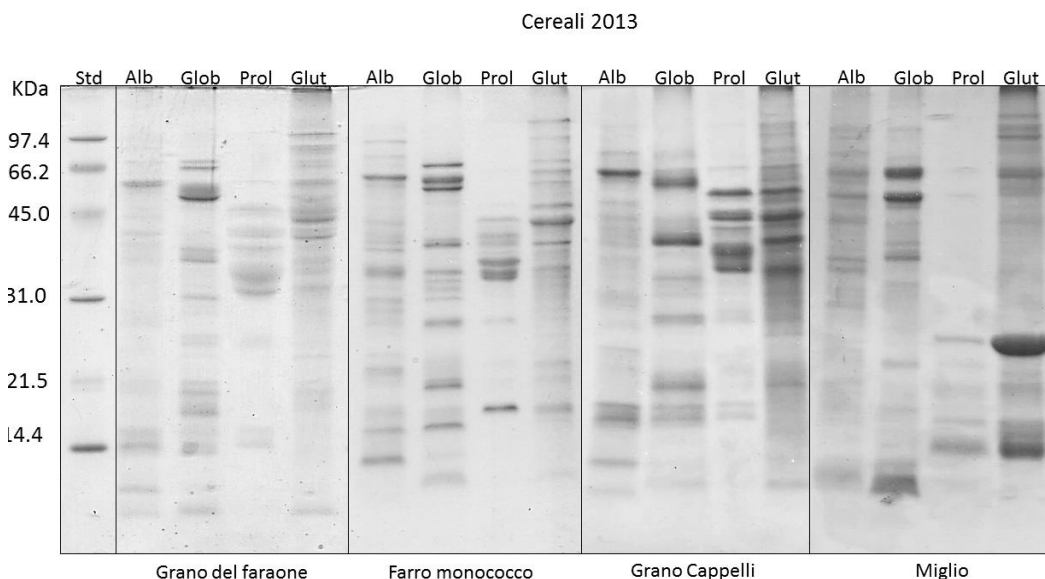


Figura 2.3.2.3: SDS-PAGE delle frazioni proteiche ottenute dai cereali raccolti nel 2013

3.2.4 Cotennuto amminoacidico nei cereali

Nei cereali raccolti nel 2012 (**Figura 1.3.24**), la lisina presentava concentrazioni molto minori rispetto a quelle dei legumi 2012. Il valore di lisina più alto è stato osservato nel grano Cappelli (9,7 mg/g di sfarinato) mentre il contenuto minore nel farro dicocco (8,1 mg/g di sfarinato). Relativamente ai due aminoacidi solforati, in tutti campioni di cereali il contenuto di cisteina era superiore a quello della metionina. Il grano del faraone mostrava rispettivamente il più alto livello di cisteina (8,1 mg/g di sfarinato) e il più basso di metionina (1 mg/g di sfarinato). Il minor contenuto di cisteina era presente nel farro dicocco (5 mg/g sfarinato), mentre il massimo contenuto di metionina era riscontrato nel farro monococco (3,7 mg/g sfarinato).

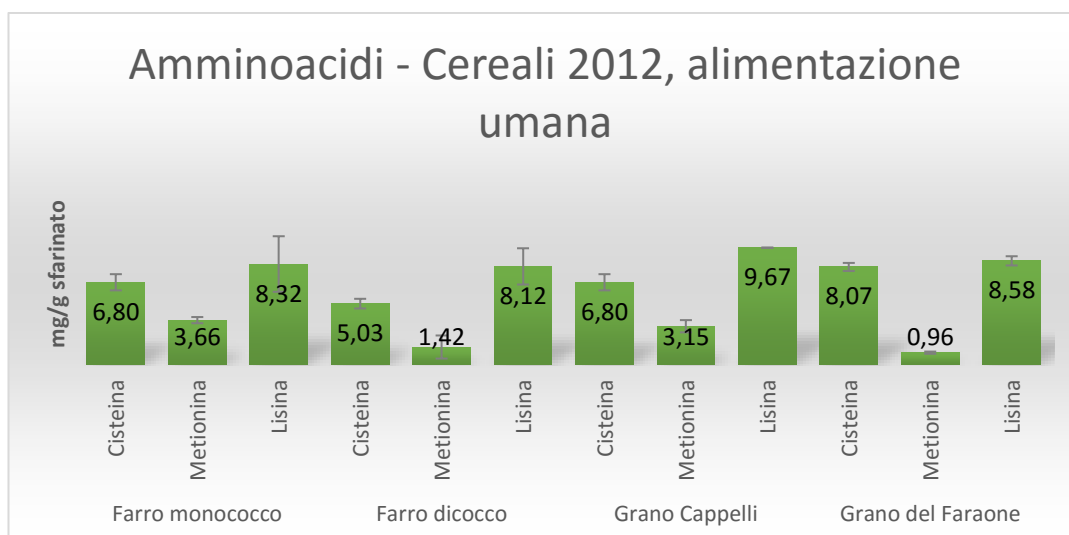


Figura 1.3.24: Contenuto degli aminoacidi cisteina, lisina e metionina nelle granelle di cereali destinate all'alimentazione umana, raccolte nel 2012. Gli istogrammi riportano i valori medi \pm deviazione standard.

Per i cereali raccolti nel 2013 (**Figura 2.3.24**), i contenuti più elevati di cisteina e lisina sono stati misurati nel miglio decorticato, con un valore medio di 21 e 10,8 mg/g di sfarinato rispettivamente. Il contenuto minore di lisina era presente nel farro monococco (5,8 mg/g di sfarinato; -31% rispetto al 2012). Riguardo il contenuto di metionina, il grano del faraone mostrava il livello più elevato (4,7 mg/g di sfarinato; circa 4 volte superiore rispetto al 2012) mentre il minor contenuto di questo

aminoacido era presente nel farro monococco (2,5 mg/g sfarinato; -22% rispetto al 2012).

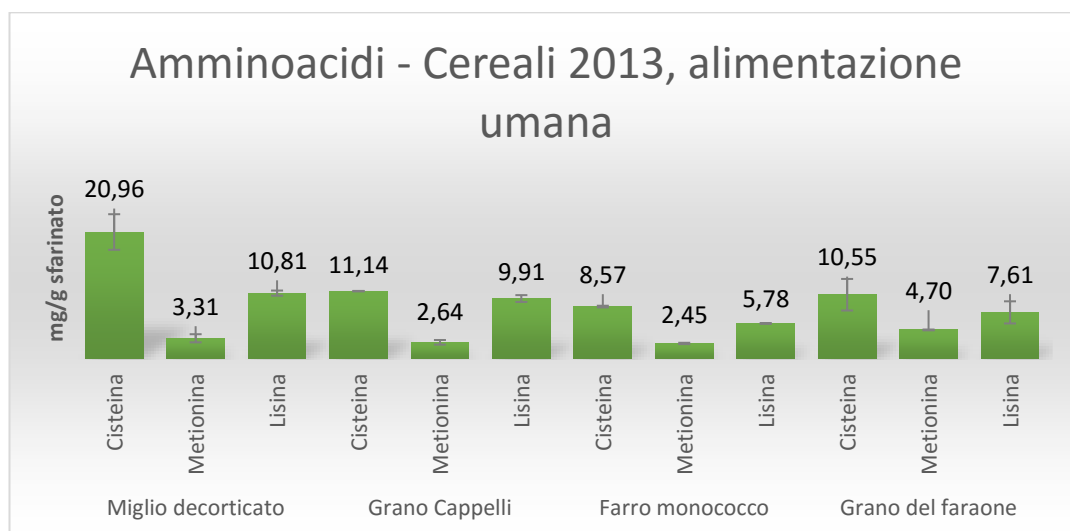


Figura 2.3.24: *Contenuto degli amminoacidi cisteina, lisina e metionina nelle granelle di cereali destinate all'alimentazione umana, raccolte nel 2013. Gli istogrammi riportano i valori medi \pm deviazione standard*

Le granelle di cereali e legumi campionate nel 2012 e destinate all'alimentazione animale (**Figura 3.3.24**) mostravano livelli diversi sia riguardo al contenuto di lisina che degli amminoacidi solforati. Come già riscontrato per i campioni destinati alla nutrizione umana, i due legumi lenticchia e cicerchia avevano livelli molto più alti di lisina rispetto ai cereali. Tuttavia, mentre i livelli di lisina contenuti nella cicerchia di 2° scelta erano del tutto simili a quelli del prodotto di prima qualità, la lenticchia di 2° scelta conteneva molta più lisina rispetto a quella per l'alimentazione umana (+80%). I tre sottoprodotti ottenuti dalla lavorazione del farro nell'anno 2012 mostravano contenuti molto simili tra loro per tutti gli amminoacidi analizzati e presentavano livelli di lisina e di cisteina superiori sia a quelli del farro monococco che dicocco destinati all'alimentazione umana.

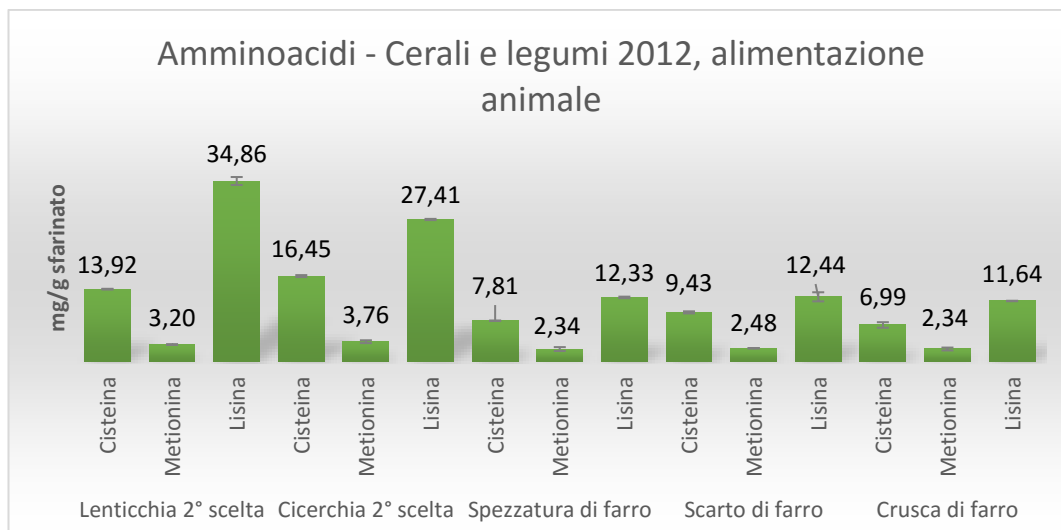


Figura 1.3.24: Contenuto degli aminoacidi cisteina, lisina e metionina nelle granelle di cereali e legumi destinate all'alimentazione animale, raccolte nel 2012. Gli istogrammi riportano i valori medi \pm deviazione standard.

I campioni di cereali destinati all'alimentazione animale raccolti nel 2013 (Figura **Figura 3.3.24**) mostravano contenuti diversi sia di lisina che degli aminoacidi solforati. Sia la crusca di farro perlato che quella d'orzo avevano livelli di lisina più elevati rispetto al grano del faraone di 2° scelta (7,8 mg/g di sfarinato). Al contrario, quest'ultimo prodotto esibiva un maggior contenuto di cisteina (10,9 mg/g di sfarinato) rispetto alle due crusche (8 e 9,7 mg/g di sfarinato). La metionina è l'amminoacido meno presente in questi campioni, con un contenuto variabile tra 1,5 e 3,5 mg/g di sfarinato (crusca di farro perlato e crusca d'orzo rispettivamente). Il grano del faraone destinato all'alimentazione animale aveva contenuti molto simili a quelli raccomandati per la nutrizione umana nei livelli di cisteina e lisina, mentre il contenuto di metionina in quello di seconda scelta era inferiore.

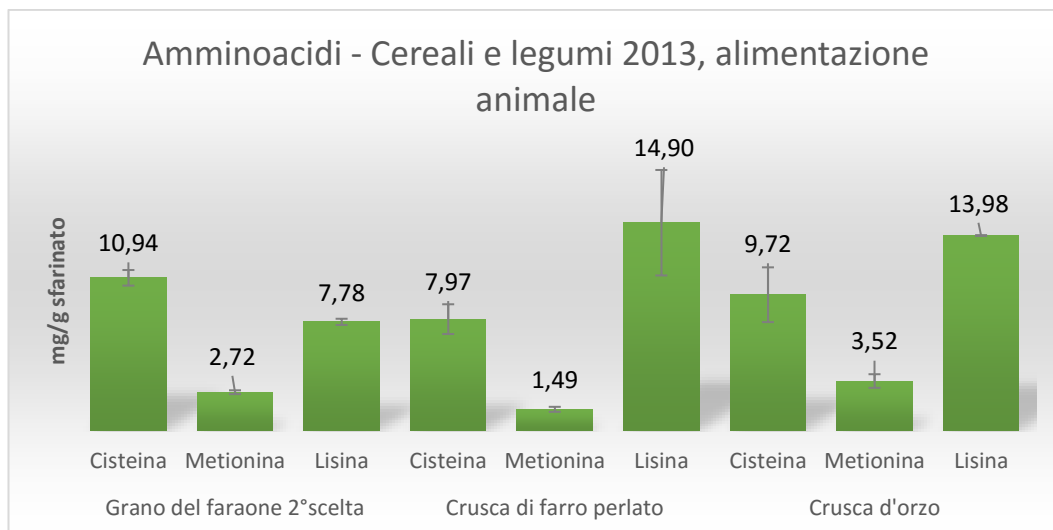


Figura 3.3.24: Contenuto degli aminoacidi cisteina, lisina e metionina nelle granelle di cereali destinate all'alimentazione animale, raccolte nel 2013. Gli istogrammi riportano i valori medi \pm deviazione standard.

Come precedentemente avvenuto per i legumi anche nei cereali si è quantificato l'intero pool amminoacidico sia nelle specie destinate all'alimentazione umana sia nelle granelle destinate a quella animale per la produzione di mangimi. I campioni di farro monococco (**Figura 4.3.2.4, 5.3.2.4**) analizzati e messi a confronto presentano due profili molto simili. Tra le differenze più evidenti troviamo la diminuzione della glicina da 33,65 mg/g nel 2012 a 11,76 mg/g nel 2013. Anche per l'acido glutammico troviamo una differenza notevole tra il 2012 (15,61mg/g) e il 2013 (112,66mg/g). Alanina e Tirosina presentano una quantità doppia nel 2012 rispetto al 2013.

Figura 4.3.2.4: Quantitativo di amminoacidi totali di farro monococco (anno 2012) espresso mg/g in sfarinato.

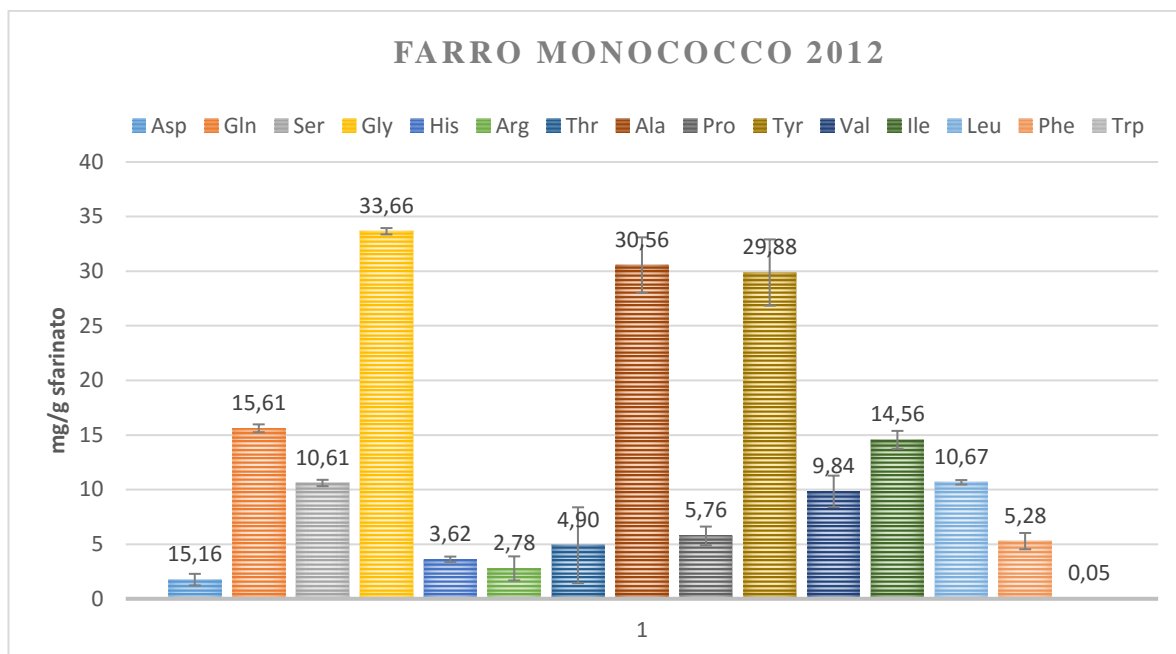
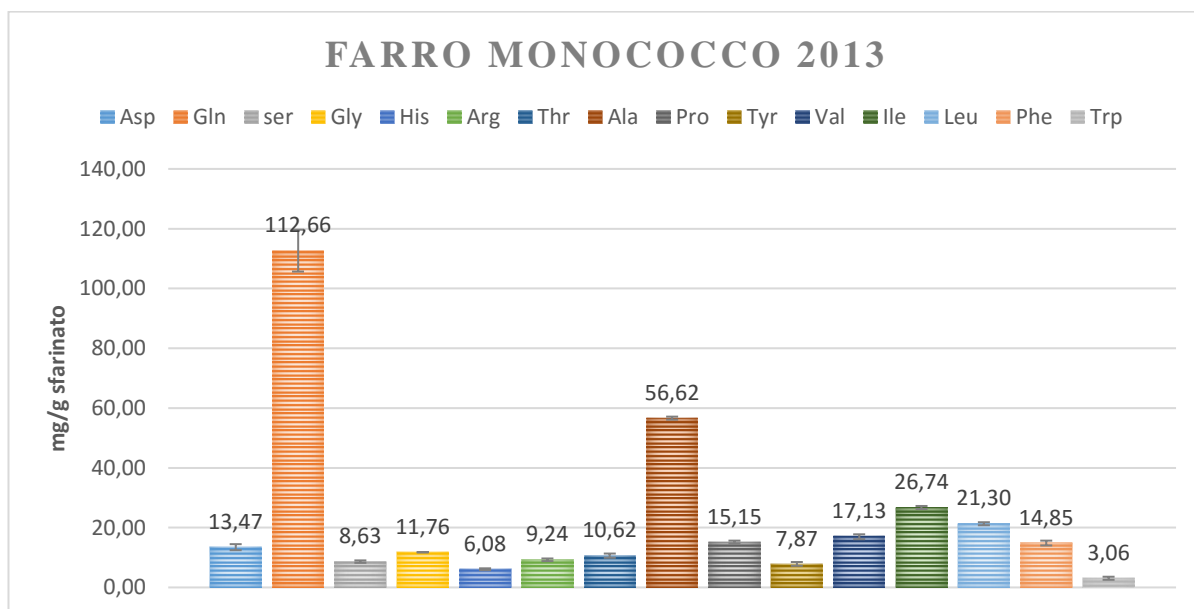


Figura 5.3.2.4: Quantitativo di amminoacidi totali di farro monococco (anno 2013) espresso mg/g in sfarinato.



Anche la varietà del farro dicocco presenta delle somiglianze col farro monococco. Tuttavia differenze si ritrovano a carico dell'acido glutammico (73,64 mg/g) che è superiore rispetto al monococco e nei quantitativi di glicina, alanina e tirosina che nel monococco variano da (29-30mg/g).

Il kamut presente solo nel 2012 presenta un profilo uguale a quello del grano cappelli. Non sono presenti molte differenze, se non per una quantità minore di glicina. Anche nei cereali il triptofano è quasi praticamente assente.

Figura 6.3.2.4: Quantitativo di amminoacidi totali di farro dicocco (anno 2012) espresso mg/g in sfarinato.

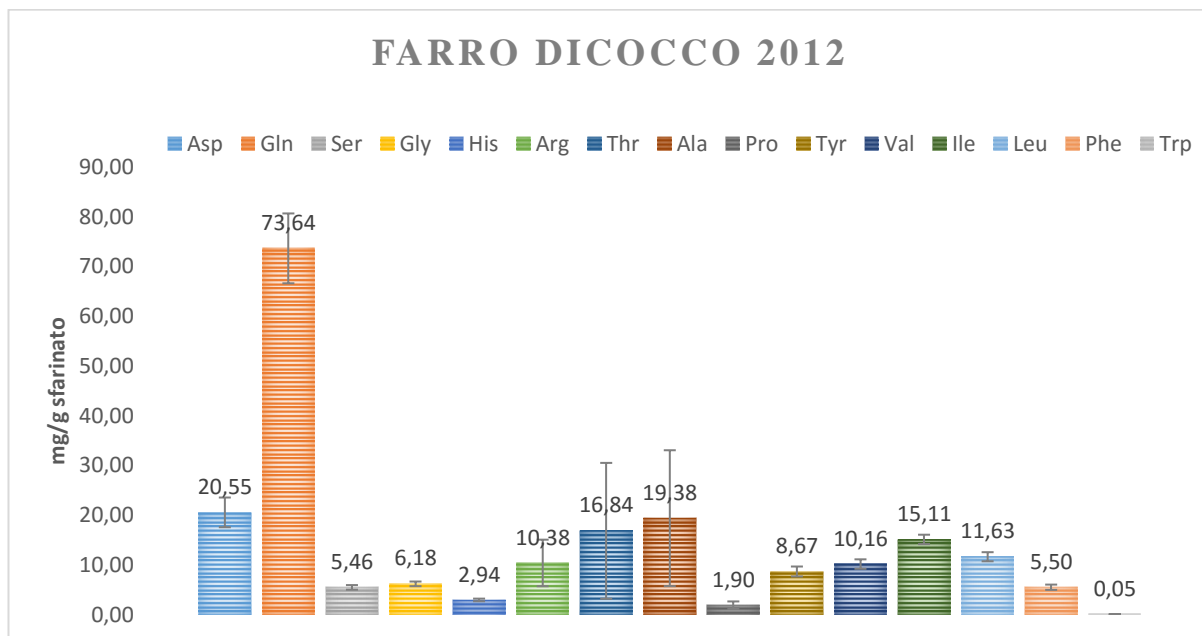
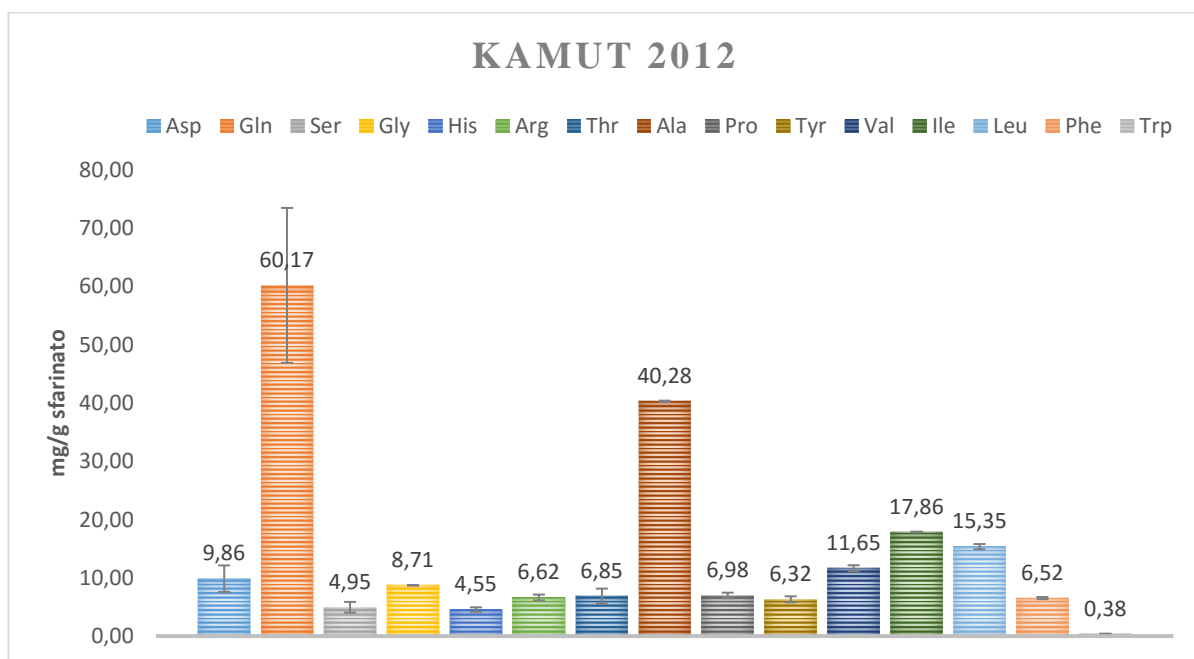


Figura 7.3.2.4: Quantitativo di amminoacidi totali di kamut (anno 2012) espresso mg/g in sfarinato.



Confrontando il grano cappelli del 2012 e quello del 2013 notiamo che i valori rimangono per lo più invariati. Una diminuzione si è presentata nelle quantità di glutammina e alanina (circa 18 mg/g).

Figura 8.3.2.4: Quantitativo di amminoacidi totali di grano cappelli (anno 2012) espresso mg/g in sfarinato.

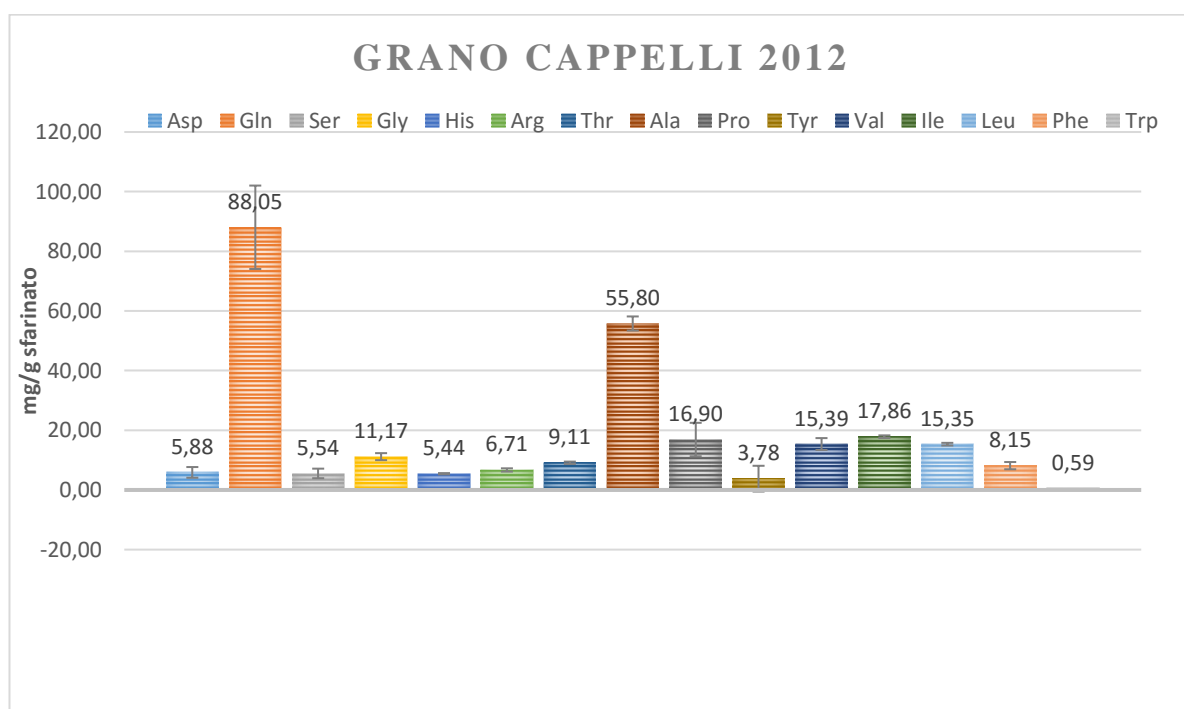
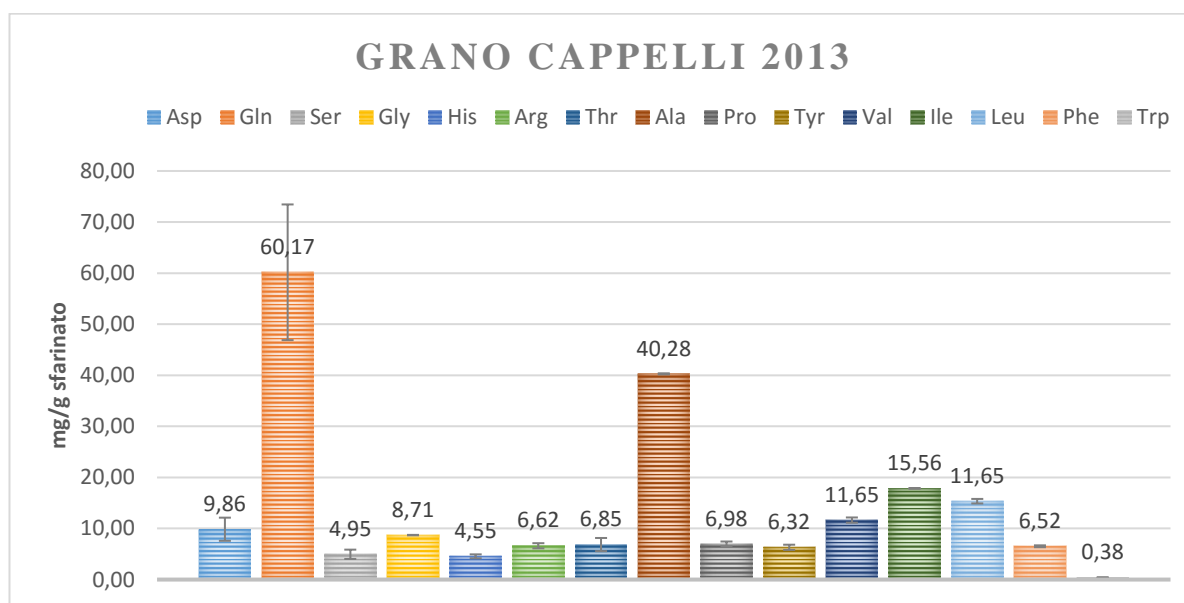
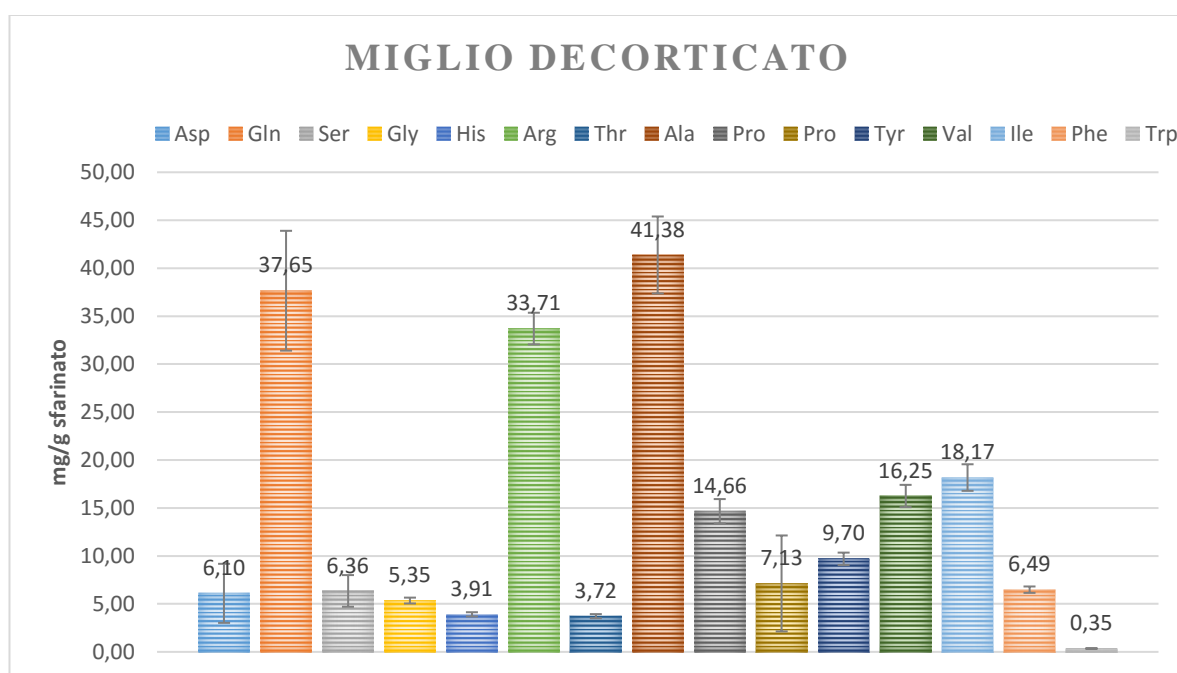


Figura 9.3.2.4: Quantitativo di amminoacidi totali di grano cappelli (anno 2013) espresso mg/g in sfarinato.



Il miglio decorticato presenta un buon contenuto di acido glutammico (37,65 mg/g) di arginina (33,71 mg/g) e di alanina (41,38 mg/g) mentre presentano valori molto bassi il triptofano, l'istidina e la treonina.

Figura 10.3.2.4: Quantitativo di amminoacidi totali di grano cappelli (anno 2012) espresso mg/g in sfarinato



Analogamente, le granelle di cereali di seconda scelta sono state sottoposte alla medesima quantificazione. La quantità di sottoprodotti di cereali destinati all'alimentazione animale sono superiori a quelle dei legumi (dove abbiamo esaminato solo la lenticchia di seconda scelta). Sono stati messi a confronto lo scarto di farro, la crusca di farro e la crusca di farro perlato, *Triticum turanicum* e la crusca d'orzo. Alla base sono tutti accomunati da una buona quantità di acido glutammico (20-36 mg/g), di acido aspartico (da 40 a 110 mg/g) e alanina con valori che oscillano fra 10 e 18 mg/g di sfarinato. I restanti amminoacidi sono presenti in quantità omogenea con valori che vanno da 50 a 100 mg/g. Dal confronto di questi dati abbiamo notato che una miscela composta da questi sottoprodotti rappresenta un buona fonte nutrizionale per l'alimentazione animale.

Figura 11.3.2.4: Quantitativo di amminoacidi totali di spezzatura di farro (anno 2012) espresso mg/g in sfarinato

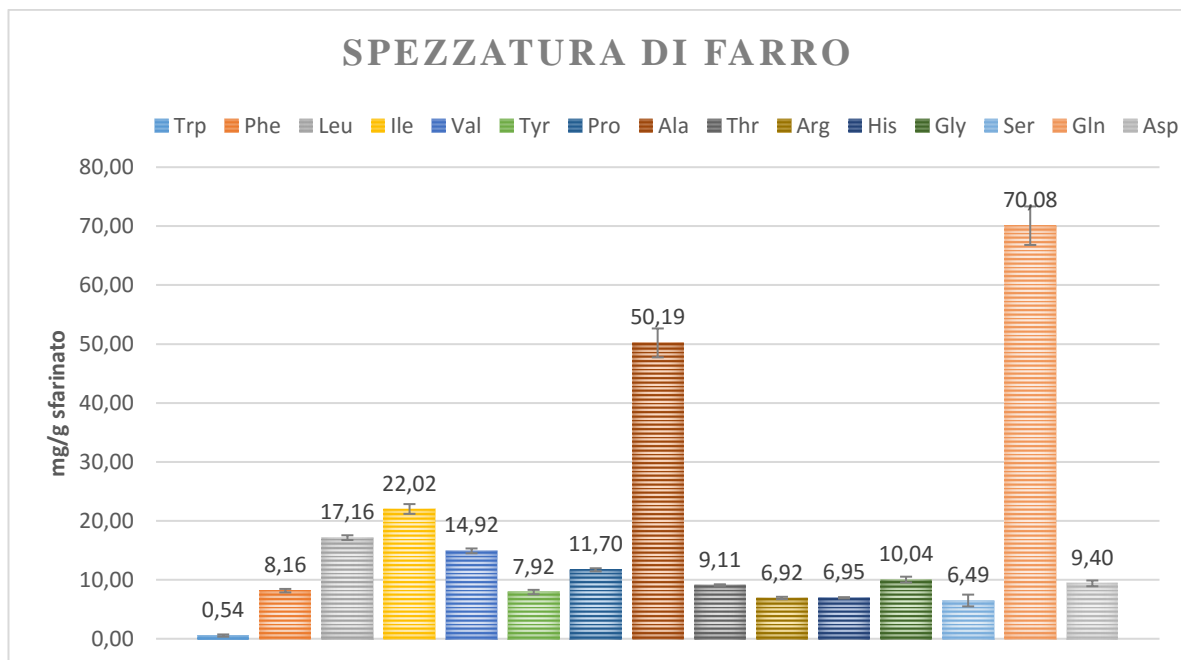


Figura 12.3.2.4: Quantitativo di amminoacidi totali di scarto di farro (anno 2012) espresso mg/g in sfarinato.

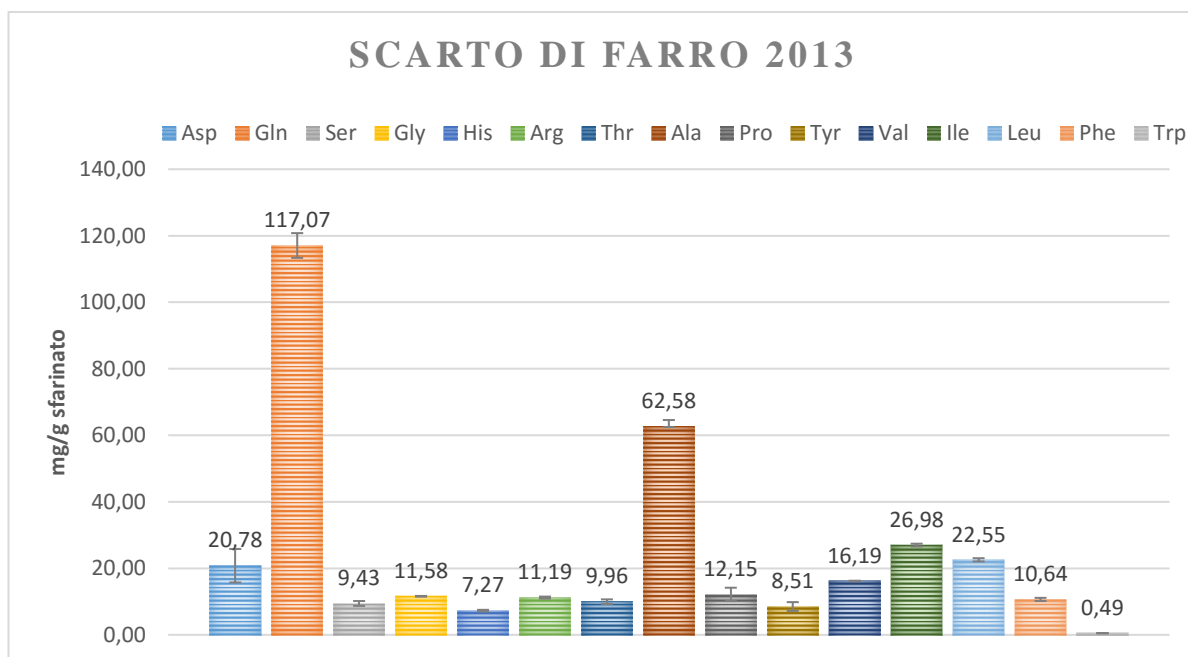


Figura 13.3.2.4: Quantitativo di amminoacidi totali di crusca di farro (anno 2012) espresso mg/g in sfarinato

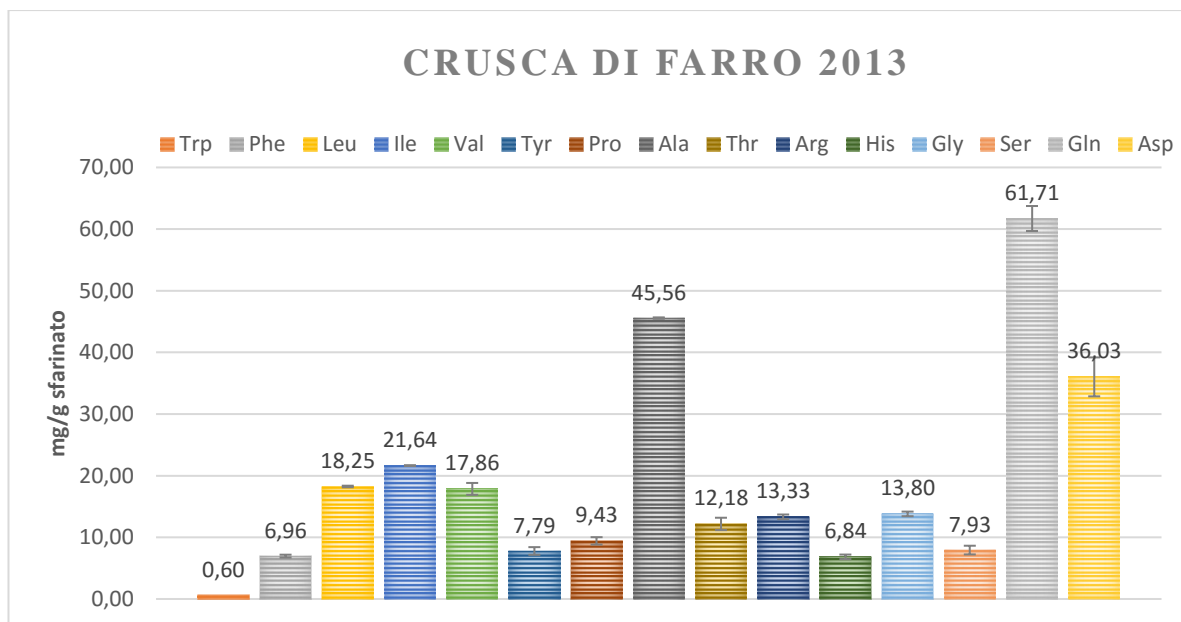


Figura 14.3.2.4: Quantitativo di amminoacidi totali di triticum turanicum (anno 2013) espresso mg/g in sfarinato

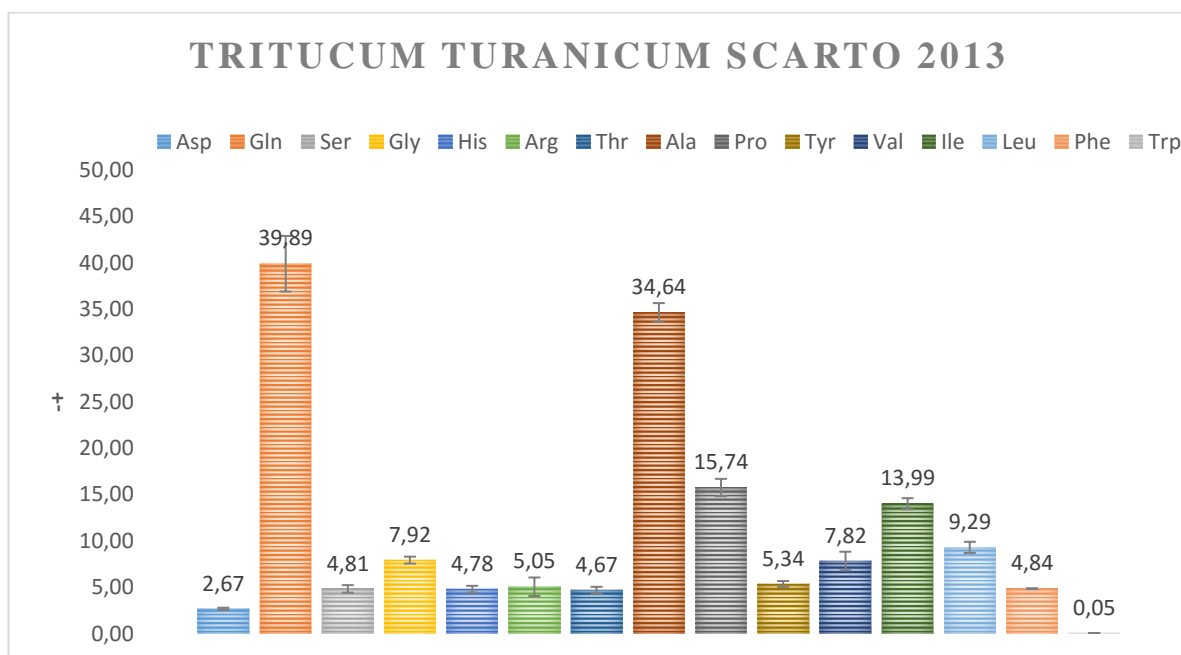


Figura 15.3.2.4: Quantitativo di amminoacidi totali di crusca di farro perlato (anno 2013) espresso mg/g in sfarinato

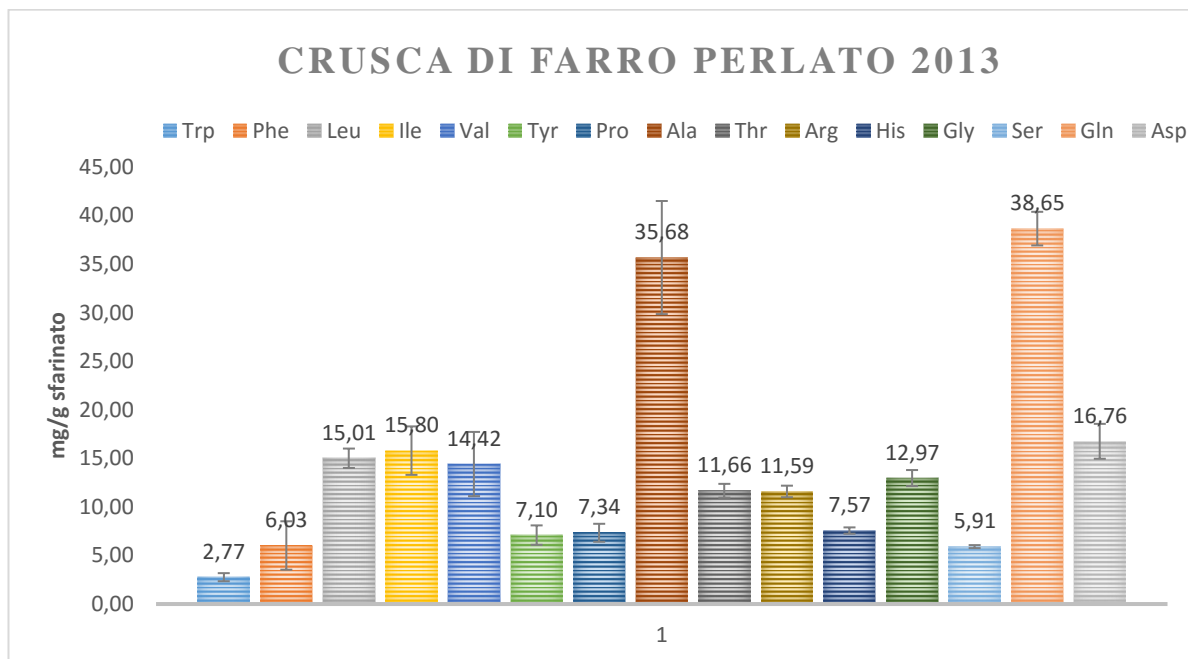
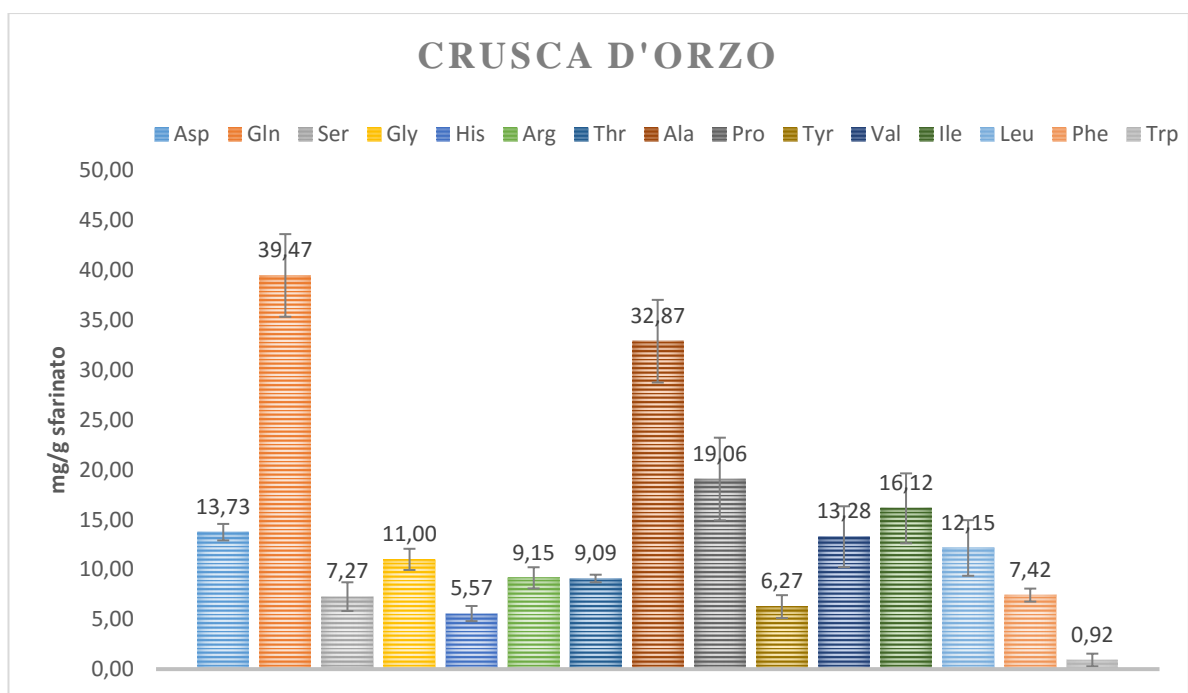


Figura 16.3.2.4: Quantitativo di amminoacidi totali di crusca d'orzo (anno 2013) espresso mg/g in sfarinato.



4. Discussione

Cereali e legumi sono oggetto continuo di studio e di attenzione, vista la grande capacità di evoluzione genetica di queste specie ad adattarsi a climi e terreni di diversa composizione e a predisporre, i legumi a simbiosi consociative con altre specie, possedendo così grande importanza economica, come prodotti primari che stanno alla base dell'alimentazione umana e animale. Enorme è l'impatto ambientale che questi prodotti hanno nel commercio mondiale, per il massivo sfruttamento delle aree coltivabili, per riuscire ad avere con cicli continui più prodotto disponibile da immettere nel canale distributivo, senza considerare quelli che sono le problematiche legate al rispetto ambientale (utilizzando fitofarmaci o integratori che permettono di rendere il terreno stabile per la durata dei cicli di coltivazione), l'ecosostenibilità, la stagionalità dei prodotti e la salvaguardia delle specie autoctone del territorio. Sempre più si è andati incontro agricoltura biologica, con particolare attenzione recupero dei prodotti del territorio, al concetto di qualità del prodotto agricolo anche in termini di nutraceutica, metodi di coltivazione e arricchimento del terreno meno invasivi. Una delle tecniche di coltivazione più usate, che rappresenta un investimento in termini di salubrità e arricchimento del terreno, di simbiosi e cooperazione tra specie vegetali diverse e soprattutto l'arricchimento bio-nutrizionale del prodotto è la consociazione (Francesco Basso 2007), infatti in questo caso i terreni usati per la coltivazione sono stati coltivati precedentemente con varietà simbiotiche come (trifoglio alessandrino, veccia, triticum turanicum) che portano ad un arricchimento del suolo. Nel presente lavoro si è verificato se tali varietà di cereali e legumi provenienti dal territorio toscano coltivati in biologico presentassero un valore nutrizionale alto. In uno studio condotto presso l'Università di Perugia nel 2005-2006, la consociazione temporanea del frumento duro con il favino aveva portato ad un incremento medio del tenore proteico della granella del cereale pari al 14,5% (Tosti e Guiducci, 2010). Analoghi risultati sono riportati su frumento duro consociato con veccia vellutata da Li Destri Nicosia et al. (2005) e da Carpi et al. (2009). Proteaginose e cereali da granella sono importanti alimenti tradizionali in molte culture in tutto il mondo e sono valutati come prodotti relativamente poco

costosi ricchi di proteine ed energia (McIntosh e Topping 2000). In Italia, le specie di cereali e legumi comunemente coltivati rappresentato il 29% della produzione mondiale, mentre i paesi in via di sviluppo hanno rappresentato il 71% (Kelley et al. 2000). Inoltre, il loro problema da loro rivestito nella diversificazione dei sistemi colturali e nel mantenimento della fertilità del suolo per sostenere la produzione agricola viene sempre più studiato dagli scienziati e affrontato dai politici (Gowda et al. 2000). Allo stato attuale, soprattutto in alcune aree marginali del Centro-Sud Italia, lo sviluppo di sistemi agricoli sostenibili e compatibili con l'ambiente ha stimolato un interesse crescente verso il ruolo di legumi da granella e di cicerchia. Analizzando e confrontando i risultati ottenuti dalla determinazione della proteina grezza fra il 2012 e il 2013 si è visto palesemente che il contenuto maggiore fra le due specie: cereali e leguminose, lo presentavano i legumi, oscillando dal 23% del cece nero e cece piccolo fino ad arrivare al 28% nella cicerchia nel 2012. La cicerchia è una coltura interessante in termini di versatilità su cui investire per la rotazione delle colture in consociazione (CG Campbell – 1997). I campioni del 2013 hanno presentato un contenuto percentuale minore oscillando tra il 16 e il 24% ma in entrambi i casi il cece nero è stato quello con il contenuto di proteina grezza inferiore anche se i valori sono simili a quelli riscontrati in una varietà diversa di cece (Phillip M. Chalk, David F. Herridge 2002). Negli scarti (lenticchia e cicerchia) dove ci si aspettava un contenuto inferiore rispetto le materie prime è presente invece un quantitativo abbastanza alto tra il 27 ed il 28% sicuramente dal contenuto proteico del tegumento esterno (Cabras e Martelli 2004). I cereali contengono quantitativi proteici relativamente ridotti se comparati ai legumi, con una media tra il 10–15% in peso secco, di cui per la metà sono rappresentati da proteine di riserva. Ciò nonostante, il consumo di cereali nel mondo è tale da fornire un apporto di proteine all'uomo e agli animali circa tre volte quello derivante dalle leguminose (Shewry e Halford, 2002). Infatti nei campioni del 2012 il contenuto di proteina grezza oscillava tra il 9% ed il 13%; nel 2013 invece c'è stato un positivo incremento con valori compresi tra 11 e il 14 %. Il campione che ha riportato un valore minore rispetto a gli altri è stato il miglio con il 10% ma non è stato possibile fare un confronto, perché non presente tra i campioni del 2013; invece il grano cappelli è quello che ha presentato il contenuto maggiore (14 %). Una diminuzione

del 3% si è verificata nel grano cappelli dal 2012 al 2013 rispetto al farro monococco e al grano del faraone. Nella granella dei sottoprodotti cerealicoli invece, provenienti dal raccolto del 2013 la percentuale media varia tra il 10% e l'11%. Un decremento significativo è stato verificato tra il grano del faraone destinato all'alimentazione umana e quella animale (26% in meno di proteina grezza). T.B. Osborne ha sviluppato una classificazione delle proteine delle piante in base alla loro solubilità in una serie di solventi: le albumine sono solubili in acqua, le globuline in soluzioni acquose saline mentre le prolamine sono solubili in soluzioni alcoliche. Quest'ultimo gruppo è più abbondante nei cereali mentre la classe più abbondante di proteine di riserva nei legumi da granella è rappresentato dalle globuline (Duranti, 2006). Le prolamine di alcuni cereali, anche conosciute come gliadine, costituiscono i principali componenti della frazione proteica del glutine (Shewry e Halford 2002) che appare come una massa gommosa originata dall'unione con le glutenine (insolubili in soluzioni alcoliche ma solubili in soluzioni acide/basiche), in presenza di acqua ed energia meccanica. Queste proteine sono presenti principalmente nell'endosperma delle cariossidi di cereali quali frumento, farro, segale e orzo. L'ingestione di glutine, e in particolare di un peptide di 33 amminoacidi dell' α -gliadina (Qiao et al. 2004), ma anche alcune γ -gliadine (Salentijn et al. 2014) può causare in soggetti geneticamente predisposti un'enteropatia accompagnata da una reazione immunitaria abnorme a cui segue un'infiammazione acuta con alterazioni morfologiche dei villi intestinali (Morón et al. 2008). L'unico trattamento efficace per la malattia celiaca è una stretta aderenza ad una dieta priva di glutine per tutta la vita del paziente che risulta nel tempo in una guarigione della mucosa intestinale (Gallagher et al. 2004). I cereali quali grano, segale, orzo e farro non sono ammessi nella dieta gluten-free in quanto contenenti glutine. Altri prodotti derivati, come ad esempio germe di grano, crusca di frumento, grano integrale, devono essere ugualmente evitati, così come pasta, pane e cracker. Tra i cereali, tuttavia, è ammesso per i pazienti celiaci il consumo di mais, riso, sorgo, avena (Saturni et al. 2010), oltre che di cereali minori (miglio) e pseudo cereali quali amaranto e quinoa. L'uso di cereali minori e pseudocereali è di interesse nutrizionale, oltre che per l'impiego nella dieta dei celiaci, anche a causa della loro migliore composizione in fibra alimentare, minerali, vitamine e

fenoli (Wijngaard e Arendt, 2006). I dati ottenuti dall'analisi delle frazioni proteiche confrontando le due annate hanno riportato che la frazione più presente nei legumi posti ad esame è quella delle globuline, e la varietà che ha presentato un livello superiore è stata la cicerchia del 2012, con un contenuto di 128,7 mg corrispondenti al 68 % delle proteine totali, valore significativo se consideriamo che in altri lavori presenti in letteratura. La frazione più abbondante è quasi sempre quella delle globuline, ma con contenuti che si aggirano sul 40% (Marina Carbonaro, George Grant 2000). E' curioso che nell'annata 2013 la cicerchia presenta valori leggermente più bassi (-17%) ed è strano se si considera che tra le due annate quella del 2012 è stata quella dove si sono presentati piccoli impedimenti climatici, meteo e colturali, al contrario del 2013 in cui la coltivazione è avvenuta senza problemi. In generale i valori di globuline nelle due annate non andava mai al di sotto del 50%, quindi con valori superiori rispetto ai dati riportati in letteratura; il cece piccino è apparso il campione più ricco in globuline insieme al fagiolo toscanello che ha incrementato dal 2012 al 2013 (+22%).

Le prolammine costituiscono la frazione meno rappresentativa (0,7-1,8%) confermando quanto riportato da Tavano e al. (2008). Un prodotto può essere considerato appropriato per la dieta dei celiaci qualora presenti valori di prolammine compresi tra il 4% e l'8% (MlyneKová et al. 2006). Considerando questo, possiamo dire che tutti i legumi del 2012 e 2013 possono essere destinati per il consumo da soggetti affetti da malattia celiaca. Le albumine sono presenti tra il 17,8 e il 28,1%; solo il fagiolo Toscanello ha presentato un valore più basso pari al 9,9%. Il cece nero ha riportato valori più alti di gluteline pari al 32,9% mentre paradossalmente nel cece fiorentino il valore è meno della metà circa il 13,1 %. Per le gluteline valori più discordanti riguardano il fagiolo toscanello che nel 2013 presentava valori più bassi dell'anno precedente; al contrario nella lenticchia questo valore aumentava rispetto al 2012, impedendo un confronto costruttivo vista la discrepanza di alcuni valori tra un'annata e l'altra. I risultati ottenuti per i cereali raccolti nel 2012 e 2013 non hanno mostrato la presenza di una frazione chiaramente più rappresentativa in nessuno di questi campioni. Ciò si allontana

dalle informazioni riportate in letteratura che indicano le prolamine come principali proteine di stoccaggio di tutti i cereali (Shewry e Halford 2002). Merlino e collaboratori (2009) riportano anche che albumine e globuline nel frumento rappresentano circa il 20-25% del contenuto proteico totale dell'endosperma. Il miglio era il cereale con i minori contenuti per tutte le 4 frazioni. In particolare, sebbene la concentrazione di prolamine sia solo 3 mg/g sfarinato, percentualmente questa frazione risulta pari all'11%, il che non garantisce il miglio come un alimento sicuro per i soggetti celiaci, diversamente da quanto riportato da altri autori (Gálová et al. 2011). Per l'analisi elettroforetica i profili analizzati non destano particolari differenze tra un'annata e l'altra per i Legumi. La cicerchia mostrava 3 bande piuttosto intense per le albumine e numerose bande per globuline e gluteline, che nel complesso erano in accordo con il profilo ottenuto da Rosa et al. (2000). Il fagiolo toscanello mostrava un segnale molto intenso per alcune bande della frazione delle globuline e alcune bande ben evidenti nelle albumine e gluteline, con un profilo assimilabile a quello ottenuto da Vasconcelos et al. (2010) per il fagiolo dall'occhio. Anche i profili proteici ottenuti dai campioni di cereali raccolti nel 2012 differivano tra loro in funzione del tipo di granella considerato (Figura 11). In tutti i campioni di cereali albumine e globuline sono caratterizzate da un ricco pattern di proteine lungo tutto il range di pesi molecolari.

In accordo a quanto mostrato da Dvoracek e Curn (2003) in *Triticum spelta*, anche nel farro dicocco e monococco da noi analizzati si possono identificare per albumine e globuline due ampie aree con bande di maggiore intensità comprese tra 66 – 23 kDa e tra 16 – 2 kDa, relativamente simili tra le due varietà. Tuttavia, 2 zone differenziano le albumine del farro monococco dal farro dicocco, localizzate i tra 66 e 45 kDa e tra 21 e 2 kDa.

Nelle due varietà di grano, Cappelli e del faraone, le albumine e le globuline mostravano pattern pressoché identici. Le prolamine (gliadine) e le gluteline (glutenine) erano anch'esse qualitativamente molto simili con un profilo paragonabile a quello riportato da Žilić e co-autori (2011) ma a livello quantitativo il grano Cappelli mostrava le bande più intense. Il miglio, campionato solo nel 2013, mostrava il pattern delle prolamine (gliadine) costituito da bande con peso molecolare (26 – 14 kDa), d'intensità inferiore a quello degli altri cereali, ma in

accordo con quanto riportato in letteratura (Kamara et al. 2009). Similmente, anche le gluteline presentano bande a maggiore intensità nella zona a più basso peso molecolare (26 – 14 kDa). Per quanto riguarda la composizione amminoacidica, cereali e legumi differiscono molto. Infatti, mentre le proteine delle leguminose contengono alti livelli di lisina, amminoacido piuttosto carente nei cereali, scarso è il loro contenuto di aminoacidi solforati, quali metionina e cisteina, presenti invece in buone quantità nei cereali (Farzana e Khalil, 1999). A livello nutrizionale è quindi utile combinare i legumi in una dieta ricca in cereali al fine di ottenere un adeguato apporto amminoacidico. Il contenuto di lisina in tutti i campioni di legumi 2012 era maggiore di quello della cisteina, che a sua volta era superiore al contenuto di metionina (Figura 10). Il minore e maggiore contenuto in lisina è stato misurato rispettivamente nel fagiolo toscanello (19,1 mg/g di sfarinato) e nella cicerchia (27,6 mg/g di sfarinato), mentre un risultato opposto è stato riscontrato per la metionina, che mostrava il contenuto maggiore nel fagiolo toscanello (6,9 mg/g di sfarinato) e minore nella cicerchia (3,8 mg/g di sfarinato). Allo stesso tempo però il fagiolo toscanello risultava il campione che possedeva il più alto contenuto di cisteina. I fagioli forniscono una buona fonte di proteine nella dieta garantendo un buon apporto di lisina (Juliano, 1999;. Uwaegbute et al, 2000) Tuttavia presentano anche delle carenze come mostrato in un lavoro sul fagiolo dall'occhio dove risultano carenti di metionina e cisteina al pari di altri legumi (Saikia et al. 1999; Mensa-Wilmot et al.2000). La composizione in amminoacidi può variare a causa di diversi fattori come la nutrizione delle piante, le pratiche culturali oltre alla varietà (Vasconcelos et al. 1997). Nel 2013, il contenuto medio di lisina in tutti i campioni di legumi era superiore a quello della cisteina, che a sua volta era di nuovo molto superiore rispetto ai contenuti di metionina. I legumi raccolti nell'anno 2013 avevano un contenuto medio di lisina compreso tra 20,9 mg/g di sfarinato del cece piccolo e 31,4 mg/g di sfarinato del fagiolo toscanello. Nei cereali raccolti nel 2012, la lisina presentava concentrazioni molto minori rispetto a quelle dei legumi 2012. Il valore di lisina più alto è stato osservato nel grano Cappelli (9,7 mg/g di sfarinato) mentre il contenuto minore nel farro dicocco (8,1 mg/g di sfarinato). Relativamente ai due amminoacidi solforati, in tutti campioni di cereali il contenuto di cisteina era superiore a quello della metionina. Nel 2013 contenuti più alti di cisteina e lisina si

sono verificati nel miglio decorticato, con un valore medio di 21 e 10,8 mg/g di sfarinato, rispettivamente. I valori riscontrati nelle altre varietà sono simili a quanto riportato in letteratura (Tkachuk e Irvine, 1969). I sottoprodotti, ricavati dagli scarti o dalla lavorazione di cereali e legumi destinati all'alimentazione animale campionati nel 2012, mostravano livelli diversi sia di lisina che degli amminoacidi solforati. Come già riscontrato per i campioni destinati alla nutrizione umana, i due legumi lenticchia e cicerchia avevano livelli molto più alti di lisina rispetto ai cereali. Tuttavia, mentre i livelli di lisina contenuti nella cicerchia di 2° scelta erano del tutto simili a quelli del prodotto di prima qualità, la lenticchia di 2° scelta conteneva molta più lisina rispetto a quella per l'alimentazione umana (+80%). I tre sottoprodotti ottenuti dalla lavorazione del farro nell'anno 2012 mostravano contenuti molto simili tra loro per tutti gli amminoacidi analizzati e presentavano livelli di lisina e di cisteina superiori sia a quelli del farro monococco che dicocco destinati all'alimentazione umana. In quelli del 2013 il grano del faraone destinato all'alimentazione animale aveva contenuti molto simili a quelli raccomandati per la nutrizione umana nei livelli di cisteina e lisina, mentre il contenuto di metionina in quello di seconda scelta era inferiore del 42%. Gli altri campioni hanno mostrato contenuti diversi sia di lisina che degli amminoacidi solforati. Sia la crusca di farro perlato che quella d'orzo avevano livelli di lisina più elevati rispetto al grano del faraone di 2° scelta (7,8 mg/g di sfarinato). Al contrario, quest'ultimo prodotto esibiva un maggior contenuto di cisteina (10,9 mg/g di sfarinato) rispetto alle due crusche (8 e 9,7 mg/g di sfarinato). La metionina è l'amminoacido meno presente in questi campioni, con un contenuto variabile tra 1,5 e 3,5 mg/g di sfarinato (crusca di farro perlato e crusca d'orzo rispettivamente). E' ovvio che ci siano delle differenze sostanziali fra le due classi di prodotti perché parte del valore proteico che possiede un legume o un cereale dipende dall'integrità della granella che viene consumata sia essa destinata all'alimentazione umana che animale. La scelta del tipo di mangime da parte degli allevatori dipende da una serie di fattori, tra cui la specie e l'età degli animali, il tipo di alimenti prodotti (carne, latte o uova) e il prezzo, la disponibilità e il valore nutritivo dei mangimi, oltre che da fattori geografici, quali la tipologia del suolo e il clima. La composizione di un mangime è molto varia, cambia in base ai prodotti che vengono miscelati (fieno, paglia,

insilati, oli e legumi cereali da granella). Più è varia la composizione più il mangime sarà completo nutrizionalmente senza tralasciare la qualità primaria che devono possedere singolarmente, come riporta l'efsa (european food safety, authority). Dall'analisi quantitativa degli scarti si notano subito valori molto alti di alcuni amminoacidi che, in alcuni casi, risultano anche superiori a quelli riscontrati nei prodotti di prima scelta; questo fatto è imputabile alla quantità di tegumento disponibile nelle crusche.

5. Conclusioni

- Le granelle di leguminose, in entrambe le annate considerate e per le due destinazioni alimentari prese in esame, presentano livelli di proteine grezze più del doppio di quelli dei cereali.

Nelle leguminose il contenuto di proteine era maggiore nel 2012 rispetto all'anno successivo, mentre per i cereali il contenuto era maggiore nelle granelle campionate nel 2013.

- La valutazione delle diverse frazioni proteiche ha mostrato che nei legumi le globuline sono le proteine di riserva più abbondanti, indipendentemente dall'annata considerata, mentre le prolamine sono presenti in percentuali bassissime. I cereali, sia del 2012 che del 2013, non mostravano invece la presenza di una frazione preponderante, perché tutte mediamente simili tra loro. Il miglio costituisce un'eccezione mostrando livelli di prolamine molto più bassi rispetto agli altri cereali. Sia legumi che cereali mostravano all'interno di ogni singola frazione una certa variabilità legata alla specie e/o varietà, ed all'annata considerata.
- L'analisi SDS-PAGE delle singole frazioni mostrava variabilità legata alla specie e/o varietà, mentre il profilo rimaneva pressoché invariato in funzione dell'annata considerata.
- L'analisi degli amminoacidi ha mostrato che i legumi (per entrambe le destinazioni alimentari) possiedono livelli più alti rispetto ai cereali sia di lisina che di metionina e cisteina. Generalmente, la lisina è l'amminoacido presente in maggiori quantità nei legumi, seguita dalla cisteina e poi dalla

metionina. Nei cereali, in generale, i livelli di lisina e cisteina non sono molto diversi tra loro con l'eccezione del miglio decorticato, dove la cisteina appare essere di gran lunga l'amminoacido più abbondante.

- L'analisi quantitativa dell'intero pool di amminoacidi ha mostrato che questi prodotti e sottoprodotti possiedono dei profili completi quantitativamente e qualitativamente. L'unico aspetto negativo riguarda la bassissima presenza del triptofano in quasi tutti i campioni analizzati.

In conclusione possiamo dire che le varietà analizzate presentano un profilo nutrizionale alto, confrontando i risultati della presente tesi con quelli di altri lavori presenti in letteratura. E' da notare che per la discrepanza fra un'annata e l'altra (in seguito alle diverse condizioni metereologiche), la mancata presenza di tutte le varietà per entrambe le annate, e il numero di annate (soltanto 2), non hanno permesso di poter fare un confronto completo fra tutte le varietà poste in analisi mostrando infatti piccole differenze che sicuramente derivano da questi fattori.

Bibliografia

- Abdel-Aal E.M., Young J.C., Rabalski I., Hucl P., Fregeau-Reid J. (2007) Identification and quantification of seed carotenoids in selected wheat species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 787–794
- Abdel-Aal E.M., Rabalski I. (2008) bioactive compounds and their antioxidant capacity in selected primitive and modern wheat species. *The Open Agriculture Journal* 2: 7-14
- Duranti M. (2006) Review: Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia* 77: 67–82
- Dvořáček V., Čurn V. (2003) Evaluation of protein fractions as biochemical markers for identification of spelt wheat cultivars (*Triticum spelta* L.) Plant soil environment 49: 99–105
- EL-Qudah J.M. (2014) Estimation of Carotenoid Contents of Selected Mediterranean Legumes by HPLC. *World Journal of Medical Sciences* 10: 89-93
- Angioloni A., Collar C. (2011) Nutritional and functional added value of oat, Kamut®, spelt, rye and buckwheat versus common wheat in breadmaking. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 1283–1292
- Angioloni A., Collar C. (2012) High legume-wheat matrices: an alternative to promote bread nutritional value meeting dough viscoelastic restrictions. *European Food Research and Technology* 234: 273–284
- Duranti M. (2006) Review: Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia* 77: 67–82
- Farzana W., Khalil, I.A. (1999) Protein quality of tropical food legumes. *Journal of Science and Technology* 23: 13–19

- Gallagher E., Gormley T.R, Arendt E.K. (2004) Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends in Food Science & Technology* 15: 143–152
- Morón B., Cebolla A., Manyani H., Alvarez-Maqueda M., Megías M., del Carmen Thomas M., López M.C., Sousa C. (2008) Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. *American Journal Clinical Nutrition* 87: 405–414
- Panfili G., Fratianni A., Irano M. (2004) Improved normal-phase high-performance liquid chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6373–6377
- Qiao S-W, Bergseng E, Molberg, Xia J, Fleckenstein B, Khosla C, Sollid LM. (2004) Antigen presentation to celiac lesion-derived T-cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *Journal of Immunology* 173:1757–1762.
- Salentijn E.M.J., Mitea D.C., Goryunova S.V., van der Meer I.M., Padioleau I., Gilissen L.J.W.J., Koning F., Smulders M.J.M. (2012) Celiac disease T-cell epitopes from gammagliadins: immunoreactivity depends on the genome of origin, transcript frequency, and flanking protein variation. *BMC Genomics*, 13: 277
- Saturni L., Ferretti G., Bacchetti T. (2010) Review: The gluten-free diet: safety and nutritional quality. *Nutrients* 2: 16-34
- Shewry P.R., Halford N.G. (2002) Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53: 947-958
- Traber M.G. (1994) Determinants of plasma vitamin E concentration. *Free Radical Biology and Medicine* 16: 229-239
- Wijngaard H.H., Arendt E. (2006) Buckwheat. *Cereal Chemistry* 83:391–401

- E-Siong T., Ah-Heng G., Swan-Choo K. (1995) Carotenoid composition and content of legumes, tubers and starchy roots by HPLC. *Malaysian Journal of Nutrition* 1: 63-74
- Gálová Z., Kečkešová M., Kopálová Z., Chňápek M., Poláčková A. (2011) Quality of cereals, pseudocereals and legume from the point of view gluten free diet. *Potravinarstvo* 5: 268-273
- Grela E.R., Gunter K.D. (1995) Short communications: Fatty acid composition and tocopherol content of some legume seeds. *Animal Feed Science and Technology* 52: 325-331
- Grela E.R., Jensen S.K., Jakobsen K (1999) Fatty acid composition and content of tocopherols and carotenoids in raw and extruded grass pea (*Lathyrus sativus* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 2075 - 2078
- Hidalgo A., Brandolini A., Pompei C., Piscozzi R. (2006) Carotenoids and tocols of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp.*monococcum* L.). *Journal of Cereal Science* 44: 182–193
- Kamara M.T., Huiming Z., Kexue Z.; Amadou I., Tarawalie F. (2009) Comparative study of chemical composition and physicochemical properties of two varieties of defatted foxtail millet flour grown in China. *American Journal of Food Technology* 4: 255-267
- Lampi A.M., Nurmi T., Ollilainen V., Piironen V. (2008) Tocopherols and tocotrienols in wheat genotypes in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 9716 - 9721
- Leenhardt F., Lyan B., Rock E., Boussard A., Potus J., Chanliaud E., Remesy C. (2006) Genetic variability of carotenoid concentration, and lipoxygenase and peroxidase activities among cultivated wheat species and bread wheat varieties. *European Journal of Agronomy* 25: 170–176
- Merlino M., Leroy P., Chambon C., Branlard G. (2009) Mapping and proteomic analysis of albumin and globulin proteins in hexaploid wheat kernels (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 18: 1321–1337

- Mlyneková Z., Chrenková M., Formelová Z. (2014) Cereals and legumes in nutrition of people with celiac disease. *International Journal of Celiac Disease* 2: 105-109
- Piironen V., Syvaöja E-L., Varo P., Salminen K, Koivistoinen P. (1986) Tocopherols and tocotrienols in cereal products from Finland. *Cereal Chemistry* 63: 78-81
- Rashidah S. Jinap S. Nazamid S. Jamilah B. (2007) Characterisation of the ability of globulins from legume seeds to produce cocoa specific aroma. *ASEAN Food Journal* 14: 103-114
- Rosa M.J.S., Ferreira R.B., Teixeira A.R. (2000) Storage Proteins from *Lathyrus sativus* Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48: 5432–5439
- Shewry P.R., Halford N.G. (2002) Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53: 947-958
- Tavano O.L., Da Silva S.I., Demonte A., Neves V.A. (2008) Nutritional responses of rats to diets based on chickpea (*Cicer arietinum*) seed meal or its protein fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11006–11010
- Vasconcelos I.M., Maia F.M.M., Farias D.F, Campello C.C., Carvalho A.F.U., Moreira R.A., Oliveira J.T.A. (2010) Protein fractions, amino acid composition and antinutritional constituents of high-yielding cowpea cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 54–60
- Zhang B., Deng Z., Tang Y., Chen P., Liu R., Ramdath D., Liu Q., Hernandez M., Tsao R. (2014) Fatty acid, carotenoid and tocopherol compositions of 20 Canadian lentil cultivars and synergistic contribution to antioxidant activities. *Food Chemistry* 161: 296–304
- Žilić S., Barać M., Pešić M., Dodig D., Ignjatović-Micić D. (2011) Characterization of proteins from grain of different bread and durum wheat genotypes. *International Journal of Molecular Science* 12: 5878-5894
- Perspectives into Factors Limiting in Vivo Digestion of Legume Proteins: Antinutritional Compounds or Storage Proteins?

- Marina Carbonaro ,*† George Grant ,‡ Marsilio Cappelloni ,† and Arpad Pusztai ‡
- Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, Via Ardeatina 546, 00178 Roma, Italy, and Rowett Research Institute, Greenburn Road, Bucksburn, Aberdeen AB21 9SB, Scotland, U.K.
- Yust, M.M., Pedroche, J., Giron-Calle, J., Alaiz, M., Millan, F., & Vioque, J. (2003). Production of ACE inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chemistry*, 81, 363-369.
- Zhang, J. (1994). Extraction and functionalities of flaxseed protein. M.Sc. Thesis. Wuxi University of Light Industry, Wuxi, China.
- Yoshikawa, M., Fujita, H., Matoba, N., Takenaka, Y., Yamamoto, T., Yamauchi, R., Tsuruki, H., & Takahata, K. (2000). Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle related diseases. *Biofactors*, 12(1-4), 143-146.
-
- Wolf, W.J. and Nelsen, T.C. (1996). Partial purification and characterization of the 15S globulin of soybeans, a dimer of glycinin. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 785–791.
- Francesco basso, (Piante alimentari e proteaginose, aspetti bioagronomici, qualitativi e nutrizionali 2007)
- Angelo Fascarelli e Francesca Oliviero, (Rivista n°12 settembre 2009) i prezzi dei cereali in Italia tra 1993-2012.
- Ivo Cozzani, Enrico Dainese, biochimica degli alimenti e della nutrizione (Piccin).
- Paolo Cabras, Aldo Martelli, chimica degli alimenti-nutrienti, alimenti di origine vegetale,alimeti di origine animale, integratori alimentari, bevande, sostanze indesiderabili (Piccin).
- Patrizia Cappelli Vanna Vanucchi, chimica degli alimenti-conservazione e trasformazione, (zanichelli).

- Francesco basso, (2007) piante alimentari-cereali e proteaginose, aspetti bioagronomici, qualitativi e nutrizionali.